

Aus dem Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung
Direktorin: Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat Brigitte M. Pützer
der Universitätsmedizin Rostock

und

der Klinik und Poliklinik für Urologie
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg
der Universitätsmedizin Rostock

Der Transkriptionsfaktor E2F1 in Peniskarzinomzellkulturen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des akademischen
Grades Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von:

Ferdinand Fenner

geb. am: 05.08.1986

in: Hannover

1. Gutachter:

Univ. Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg
Klinik und Poliklinik für Urologie, Rostock

2. Gutachter:

Univ. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat Brigitte Pützer
Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung, Rostock

3. Gutachter:

Univ. Prof. Dr. med. Maurice Stephan Michel
Universitätsklinik für Urologie, Mannheim

Tag der Einreichung: 30.05.2016

Tag der Disputation: 14.12.2016

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	3
1.1 Karzinogenese und maligne Progression.....	3
1.1.1 Epithelial-Mesenchymale-Transition und Invasion.....	4
1.2 Das Peniskarzinom.....	7
1.2.1 Epidemiologie.....	7
1.2.2 Pathologie.....	8
1.2.3 Therapiemöglichkeiten.....	10
1.2.4 Prognose	11
1.2.5 Molekularbiologie des Peniskarzinoms.....	12
1.3 Der Transkriptionsfaktor E2F1.....	13
1.3.1 Der Rb/E2F Signalweg.....	13
1.3.2 Onkogene Eigenschaften von E2F1.....	15
1.3.2.1 E2F1 Beteiligung an invasivem Wachstum und Metastasierung.....	15
1.3.2.2 E2F1 und Zytostatikaresistenz	17
1.4 Zielstellung der Arbeit.....	18
2 Materialien und Methoden.....	20
2.1 Materialien.....	20
2.1.1 Zelllinien.....	20
2.1.2 Chemikalien.....	21
2.1.2.1 Chemikalien.....	21
2.1.2.2 Lösungen und Puffer.....	22
2.1.2.3 Wachstumsmedien der Zellkulturen.....	23
2.1.3 Antikörper.....	24
2.1.4 Plasmide.....	25
2.1.5 Virale Vektoren.....	26
2.1.6 Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.7 Kits.....	29
2.1.8 Verwendete Software.....	29
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Protein-Arbeitstechniken.....	30
2.2.1.1 Proteinisolierung aus den Zellen.....	30

2.2.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	30
2.2.1.3 Western Blot.....	31
2.2.1.3.1 Herstellung von Polyacrylamidgel.....	31
2.2.1.3.2 SDS Page und Blotten.....	31
2.2.1.3.3 Nachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern.....	32
2.2.1.3.4 Einsatz des Stripping Buffers zum Nachweiss von β -Aktin.....	33
2.2.2 Allgemeine Arbeitstechniken mit Zellkulturen.....	33
2.2.2.1 Passagieren von Zelllinien.....	33
2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl.....	34
2.2.3 Genetische Modifikation von Zelllinien durch virale Vektoren.....	34
2.2.3.1 Adenovirale Transduktion.....	35
2.2.3.2 Lentivirale Transduktion.....	35
2.2.3.3 Transfektion der Zelllinien.....	36
2.2.4 Funktionsuntersuchungen	37
2.2.4.1 Invasivitätsmessung mittels Boyden-Chamber-Assay.....	37
2.2.4.2 Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrieanalyse	38
2.2.4.3 Zellvitalitätsbestimmung mittels XTT-Assay.....	39
2.2.5 Statistik.....	40
2.2.5.1 Mittelwert, Varianz und Standardabweichung.....	40
2.2.5.2 Signifikanztestung durch den T-Test bei unabhängigen Stichproben.....	41
3 Ergebnisse.....	42
3.1 Charakterisierung der Zelllinien auf Proteinebene.....	42
3.1.1 Bestimmung des RB/E2F1 Signalweges.....	42
3.1.2 Bestimmung des p53-Status.....	43
3.1.3 Bestimmung bekannter Marker der Epithelial-Mesenchymalen Transition in Peniskarzinomzelllinien.....	44
3.2 Regulation der EMT-Marker durch E2F1.....	45
3.2.1 Überprüfung der Infizierbarkeit der Lymphknotenmetastasenzellen.....	45
3.2.2 Überprüfung der Regulierbarkeit der EMT-Marker durch E2F1.....	46
3.3 Untersuchung der Tumorzelllinien in Funktionsassays.....	48
3.3.1 Charakterisierung der Zytostatikaresistenz.....	48
3.3.1.1 Zytostatikaresistenzmessung mittels FACS.....	48
3.3.1.2 Zytostatikaresistenzmessung mittels XTT-Assay.....	51

3.3.2 Sensibilisierung Zytostatika-resistenter Peniskarzinomzelllinien durch E2F1-Knockdown.....	52
3.3.2.1 E2F1-Knockdown mittels adenoviralem Vektor.....	53
3.3.2.2 E2F1 Knockdown mittels lentiviralem Vektor	54
3.3.3 Charakterisierung der Invasivität mittels Boyden-Chamber-Assay.....	56
3.3.4 E2F1-Knockdown führt zur Abnahme der Invasivität von Peniskarzinomzellkulturen.....	57
3.3.5 Zunahme des invasiven Potentials von Peniskarzinomzellkulturen durch ektope E2F1-Expression.....	58
3.3.6 Charakterisierung der Proliferation mittels XTT-Assay.....	60
3.3.7 Proliferations-Assays bei E2F1 Knockdown und Überexpression.....	61
4 Diskussion.....	64
4.1 Der Rb/E2F-Signalweg.....	66
4.2 Die EMT in Peniskarzinomzelllinien.....	67
4.3 Funktionelle Eigenschaften der Zellkulturen.....	69
4.4 E2F1 und die Zytostatikaresistenz.....	73
4.5 Vergleich der verschiedenen Zytostatika.....	74
4.6 Zusammenfassung.....	76
5 Ausblick.....	78
6 Literaturverzeichnis.....	81
7 Anhang.....	100
7.1 Thesen für die Disputation.....	100
7.2 Selbstständigkeitserklärung	102

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aes	<i>amino-terminal enhancer of split</i>
Aqua. dest.	destilliertes Wasser
ca.	circa
CdK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
HPV	<i>humanes Papillomavirus</i>
KGM	<i>Keratinocyte Growth Medium 2</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
MAP	<i>Mitogen-activated Protein</i>
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MDM2	<i>Mouse double minute 2</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PSCC	<i>penile squamous cell carcinoma</i>
Rb	Retinoblastomaprotein
RHAMM	<i>receptor for hyaluron-mediated motility</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
RISC-Komplex	<i>RNA-induced silencing complex</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute's Medium</i>
s.o.	siehe oben
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
SoV	<i>Sodium orthovanadate</i>

TBS	<i>Tris-Buffered Saline Puffer</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Puffer and Tween 20</i>
TGFb	<i>transforming growth facktor-b</i>
VEGF-C	<i>vascular endothelial growth factor-C</i>
VEGFR-3	<i>vascular endothelial growth factor receptor-3</i>

Des Weiteren wurden die Einheiten des SI-Systems und die für den deutschsprachigen Raum gültigen Nomenklaturen für Namen und Formeln chemischer Verbindungen verwendet.

1 Einleitung

1.1 Karzinogenese und maligne Progression

Eine Mutation in einem Gen, welches für den Zellzyklus zuständig ist, leitet die Karzinogenese ein [1]. Dies stellt die erste Phase der Entstehung maligner Tumore dar. In der zweiten Phase kommt es zu einer Wachstumsförderung der mutierten Zellen. Dies entsteht unter dem Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren, Karzinogenen oder Hormonen [1]. Die dritte Phase beschreibt die maligne Progression. Kennzeichnend für diese Stufe der Tumorentwicklung ist das infiltrierende Wachstum der Zellen in gesundes Gewebe [1]. Generell sind dabei mehrere kennzeichnende Fähigkeiten beschrieben, die die Eigenschaften der Tumore verändern [1]. Diese Fähigkeiten sind zum Beispiel der Erhalt proliferativer Signale, die Unterdrückung proliferationssuppressiver Signale, der Widerstand gegenüber apoptose induzierender Signale, der Erhalt replikativer Seneszenz, die Induktion von Angiogenese und die Invasion der Tumorzellen in umliegendes Gewebe mit nachfolgender Metastasierung [1]. Als Motor der malignen Progression wird eine genetische Instabilität mit fortschreitendem Allelverlust und Mutation von Tumorsuppressorgenen verantwortlich gemacht [1]. Die Bildung von sekundären Tumorabsiedlungen, auch Metastasen genannt, ist dabei die Hauptursache von Todesfällen [2]. Der Vorgang der Metastasierung ist ein mehrstufiger Prozess, der trotz fortschreitender Forschung bis jetzt schlecht verstanden ist [3]. Grundsätzlich wird jedoch angenommen, dass durch Veränderung der zellulären Struktur, beispielsweise durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die Fähigkeit zu invasivem Wachstum und Migration (Motilität) erhöht wird [4]. Durch dieses invasive Wachstum sind die Tumorzellen dazu befähigt, natürliche Barrieren wie zum Beispiel die subepitheliale Basalmembran zu überwinden [4]. Außerdem sind fortgeschrittene Tumorzellen in der Lage Angiogenese zu induzieren [1]. Tumorinduzierte Gefäße unterscheiden sich jedoch maßgeblich von Gefäßen in nicht entartetem Gewebe. Sie sind häufig stark gewunden, porös und in einem ständigen Umbauprozess [5]. Durch diese beiden Eigenschaften sind die Tumorzellen in der Lage, sich aus dem Primärtumorverbund zu lösen und in neu gebildete Gefäße einzudringen [1]. Nachfolgend sind einige der zirkulierenden Tumorzellen in der Lage, das Gefäßsystem wieder zu verlassen und Metastasen in anderen Organen zu bilden [6]. Bei

diesem Prozess wird die EMT in umgekehrter Weise wiederholt, was als mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet wird [1]. Der schematische Ablauf der Metastasierung in Bezug auf die EMT ist in nachfolgender Darstellung abgebildet (siehe Abb. 1).

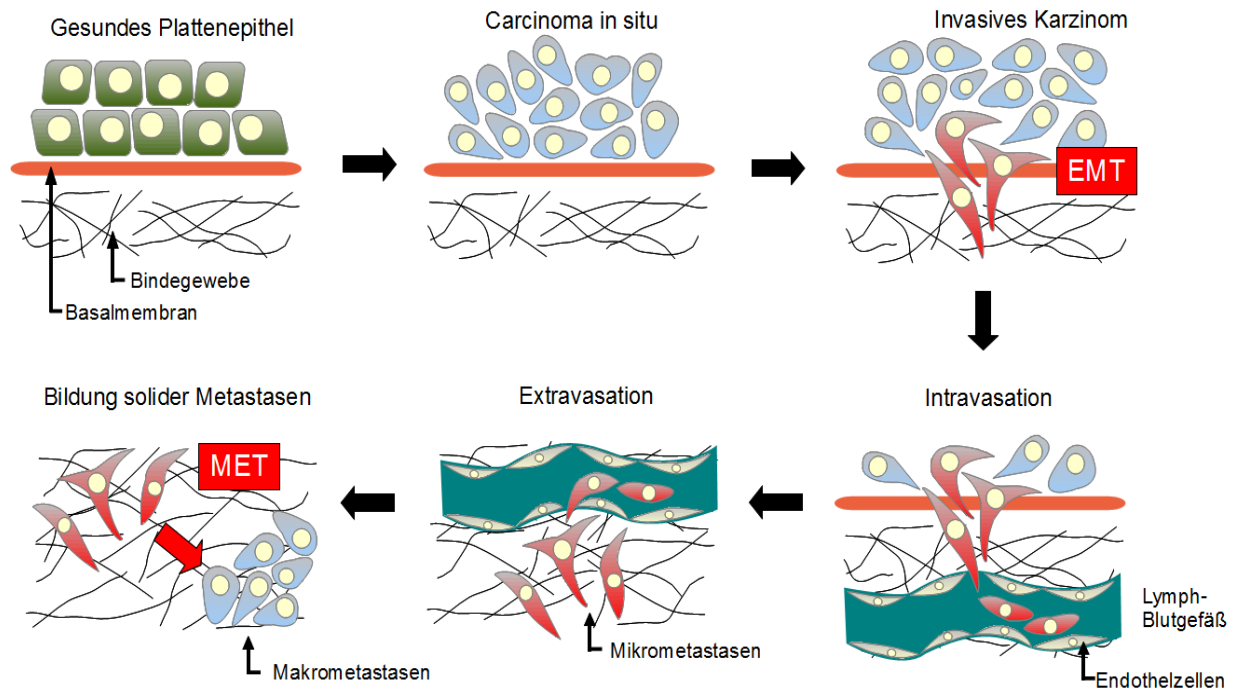


Abb. 1: Schematische Darstellung der EMT während der Metastasierung. Durch die EMT verändert sich der Phänotyp der Tumorzellen, sodass ein Durchdringen der Basalmembran (Invasion) und eine aktive Fortbewegung im Extrazellulärraum (Migration) möglich werden. Nach erfolgter Intravasation und Extravasation verändert sich abermals der Phänotyp der Zellen durch MET. Folglich können makroskopisch sichtbare Metastasen entstehen. Modifiziert nach „the basics of epithelial-mesenchymal transition“ Raghu Kalluri, 2009.

1.1.1 Epithelial-Mesenchymale-Transition und Invasion

Die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein physiologischer Prozess während der Embryonalentwicklung, bei Gastrulationsbewegungen und zur Entstehung der Neuralrinne [7]. Auch wird dieser Prozess in ähnlicher Form bei der gewöhnlichen Wundheilung eines erwachsenen Menschen rekapituliert [8]. Bei Ablauf der EMT werden epitheliale Zellen dazu befähigt, sich aus ihrem Zellverband zu lösen und sich invasiv durch extrazelluläre Matrix zu bewegen. Hierbei wird keine Apoptose eingeleitet [9], [10]. Der charakteristische apikal-basale Aufbau der Epithelzellen, sowie der enge zelluläre Kontakt (durch tight junctions, adherens junctions und Desmosomen) muss dafür im

Vorfeld aufgelöst werden um den Zellen die Fähigkeit zu aktiver Bewegung zu verschaffen [9], [10]. Diese Fähigkeit gewinnen einige Tumorzellen im Rahmen der malignen Progression zurück, wodurch es zu invasivem Wachstum, Metastasierung und Ausbildung einer Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen kommen kann [4], [10]–[12]. Während dieses Vorgangs kommt es zur Aktivierung spezifischer Gene, die charakteristisch für die EMT sind [10]. Andere Gene werden typischerweise herabreguliert [10]. E-Cadherin ist ein wichtiges Adhäsionsmolekül, das für die Aufrechterhaltung der Zellkontakte und den epithelialen, polaren Aufbau benötigt wird [13]. Durch E-Cadherin wird also maßgeblich die physiologische Funktion und Integration der Zellen in einem Zellverband bestimmt [14]. Der Verlust des für epitheliale Zellen charakteristischen E-Cadherins wurde bereits, in diesem Zusammenhang im Peniskarzinom beschrieben [15]. Bei geringer E-Cadherin Expression im Peniskarzinomgewebe besteht ein signifikant höheres Risiko für die Bildung von Lymphknotenmetastasen [15]. Andererseits wird während der EMT die Expression des Adhäsionsmoleküls N-Cadherin aktiviert, welches die Zellmigration in der Organogenese unterstützt [14]. N-Cadherin ist wie E-Cadherin ein Adhäsionsmolekül, das durch transmembranöse Anteile einen Kontakt mit der Extrazellulärmatrix oder anderen Zellen herstellen kann [14]. Allgemein wird N-Cadherin als funktioneller Gegenspieler zu E-Cadherin bezeichnet, der in vielen Tumorentitäten zu einem invasiven Phänotyp führt [16], [17]. Zusätzlich kann N-Cadherin durch die Aktivierung von Faktoren wie dem AKT Signalweg (Proteinkinase B Signalweg) eine antiapoptotische Wirkung auf die Zelle erzielen [17]. Dieser AKT-Signalweg ist an der Regulation mehrerer zellulärer Prozesse beteiligt [18]. Unter anderem vermittelt AKT eine Inaktivierung des Apoptose auslösenden Proteins p53 durch das MDM2 (*Mouse double minute 2*) Protein [19], sowie eine Antagonisierung der apoptotisch wirkenden Proteine BAD (Bcl-2 Familie) und Procaspase-9 [20]. Diese durch N-Cadherin vermittelte AKT Inaktivierung des BAD-Proteins konnte bereits bei malignen Melanomzellen nachgewiesen werden [17]. Ebenso wird während der EMT das Intermediärfilament Vimentin exprimiert, welches charakteristisch für mesenchymale Zellen ist [21]. Vimentin ist ein Intermediärfilament, welches die zelluläre Migrationsfähigkeit erhöht [22]. Bei Kopf-Hals-Karzinomen wurde bereits ein klinischer Zusammenhang zwischen einer hohen Vimentin, einer geringen E-Cadherin Expression und erfolgter Metastasierung nachgewiesen [23]. Allgemein wird Vimentin somit wie N-Cadherin als Marker der EMT angesehen [24].

Als Regulatoren der EMT ist bis heute eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren bekannt [25]. Einer dieser bekannten Transkriptionsfaktor ist Slug aus der Snail Familie [26]. Dabei ist Slug nicht nur für die Induktion der EMT, sondern auch für eine Herabregulation von E-Cadherin und für eine Resistenz gegenüber Apoptose auslösender Signale verantwortlich [26]–[28]. Bei Slug Expression zeigt sich in zahlreichen Tumorentitäten, wie zum Beispiel dem kolorektalen Karzinom oder dem ösophagealen Plattenepithelkarzinom eine Prognoseverschlechterung [29], [30]. Beim Mammakarzinom konnte sogar eine direkte statistische Korrelation zwischen einer hohen Expressionen von Slug und dem Vorkommen von Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden [31]. Als weiterer Regulator der EMT wurde kürzlich RHAMM (*receptor for hyaluron-mediated motility*) identifiziert [32]. Dieser Rezeptor induziert in Verbindung mit dem Transkriptionsfaktor E2F1 die Bildung von Fibronektin [32]. Durch erhöhte Fibronektinbildung steigt die Motilität der Tumorzellen. Folglich wird Fibronektin als mesenchymaler Marker der EMT genutzt [33]. Ebenso scheint die Mikroumgebung der einzelnen Tumorzellen einen deutlichen Einfluss auf die EMT zu haben [34]. So konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine hypoxische Stoffwechselsituation für Tumorzellen eine EMT einleitet. Eine Schlüsselrolle spielt dabei der Transkriptionsfaktor HIF1- α [35], [36]. Außerdem scheinen mehrere microRNAs an der Regulation der EMT beteiligt zu sein [10]. So konnten bereits beim Mammakarzinom mehrere microRNAs aus der miR-200 Familie identifiziert werden, die einer EMT entgegenwirken [37]. Weiterhin wurde bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) die microRNA miR-137 identifiziert, die ebenfalls der EMT entgegenwirkt [38]. Dies sind nur zwei Beispiele für ein ständig wachsendes Netzwerk von microRNAs, die einen Einfluss auf die EMT haben.

Zusammenfassend ist die EMT ein zellulärer Prozess, durch welchen maligne Zellen im Rahmen der Tumorprogression die Fähigkeit erlangen, invasiv umliegendes Gewebe zu infiltrieren. Dabei gewinnen die Tumorzellen die Fähigkeit, apoptoseauslösende Signale zu unterdrücken [10]. Im Zuge dessen entwickelt sich eine gesteigerte Resistenz gegenüber Zytostatika [10]. Dies ist eine Voraussetzung für die Bildung von metastatischen Absiedlungen im restlichen Körper, welche in vielen Tumorentitäten eine massive Verschlechterung der Prognose mit sich bringt [1]. Das Peniskarzinom ist eine hauptsächlich lymphogen metastasierende Tumorerkrankung, bei der die Bildung von Lymphknotenmetastasen prognosebestimmend ist [39], [40].

1.2 Das Peniskarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das Peniskarzinom ist mit circa 4000 Neuerkrankungen jährlich eine seltene Tumorentität in Europa [41]. In den Industrieländern macht es nur ca. 0,7 % der malignen Erkrankungen des Mannes aus [42]. Im Gegensatz dazu zieht das Peniskarzinom in Entwicklungsländern in Teilen Asiens, Afrikas und Südamerikas mit bis zu 10 % aller den Mann befallenden Tumore deutlich mehr Aufmerksamkeit auf sich [43]. Das Erkrankungsalter liegt in Europa bei 60 bis 70 Jahren, wobei zwei Drittel aller Fälle bei Patienten auftreten, die über 65 Jahre alt sind [44]. Die Gründe für diese geographischen Unterschiede sind weitestgehend unklar. Man kann jedoch von unterschiedlichen epidemiologischen, soziokulturellen und Faktoren ausgehen, die die Prävalenz beeinflussen [45]. Einige dieser epidemiologischen Risikofaktoren sind geringe Körperhygiene im Genitalbereich, niedriges Bildungsniveau, das Vorliegen einer Phimose, chronisch entzündliche Prozesse am Penis, die Durchführung einer Psoralen UV-A Therapie (PUVA), sowie sexuell übertragbare Krankheiten in der Patientenanamnese [45], [46]. Die Infektion mit humanem Papillomavirus (HPV) spielt offenbar eine wichtige Rolle bei der Entstehung bestimmter Subtypen des Peniskarzinoms. Dies gilt jedoch nicht für alle Varianten des Peniskarzinoms [47]. Die Durchführung einer Zirkumzision wirkt sich als protektiver Faktor gegenüber dem invasiven Peniskarzinom aus [48]. Dies gilt jedoch nur, wenn diese frühzeitig im Säuglingsalter durchgeführt wird. Die Zirkumzision im Erwachsenenalter hat keinen schützenden Effekt mehr [49].

1.2.2 Pathologie

Nach der histologischen Klassifikation durch die EAU Guidelines (*European Association of Urology*) werden maligne Läsionen am Penis in folgende Gruppen eingeteilt [50].

Histologische Klassifikation der EAU Guidelines on Penil Cancer	
Subtyp	Häufigkeit in %
klassisches Plattenepithelkarzinom	48 – 65
basaloides Karzinom	4 – 10
warziges Karzinom	7 – 10
verruköses Karzinom	3 – 8
papilläres Karzinom	5 – 15
sarcomatoides Karzinom	1 – 3
gemischtes Karzinom	9 – 10
pseudohyperplastisches Karzinom	<1
carcinoma cunilatum	<1
pseudoglanduläres Karzinom	<1
warzig-basaloides Karzinom	9 – 14
adenosquamöses Karzinom	<1
mukoepidermoid Karzinom	<1
klarzellige Variante des Peniskarzinoms	1 – 2

Es wird generell zwischen *penilen* Primärtumoren und sekundären Tumorabsiedlungen anderer Tumorentitäten (Metastasen) unterschieden. Über 80 % solcher Metastasen im Penis sind durch Blasen- und Prostatakarzinome bedingt [51]. Das Plattenepithelkarzinom macht mit ca. 95% der verschiedenen Tumorentitäten den Großteil der Peniskarzinome aus [46]. Davon sind 48-65 % klassische Plattenepithelkarzinome, 9-14 % gemischt warzig-basaloid, 9-10 % gemischt, 7-10 % warzig, 5-15 % papillär, 4-10 % basaloid, 3-8 % verrukös, 1-3 % sarkomatoid und ca 7 % lassen sich sehr seltenen Unterarten zuordnen [50]. Nicht epitheliale Tumore wie Melanome sind am Penis generell extrem selten [52]. Das penile Plattenepithelkarzinom kann sich prinzipiell überall am Penis manifestieren. Die häufigste Tumorlokalisation ist allerdings die Haut der Eichel, des Sulcus coronarius und des Präputiums [53]. Eine Lokalisation am Penisschaft ist hingegen ungewöhnlich [53]. Die Ausbreitung des Peniskarzinoms folgt zumeist einem vorhersagbaren Muster

[54]. Lokal erfolgt ein Wachstum in tiefere Hautschichten bis zur Invasion des Corpus spongiosum, der Tunica albuginea und später des Corpus cavernosum [54]. Überregional kommt es zu einer lymphogenen Metastasierung, bevorzugt in den inguinalen, oberinneren Quadranten (Sentinellymphknoten) [55], [56]. Ein Auslassen dieser Sentinellymphknoten bei lymphogener Metastasierung ist selten, aber möglich [57]. Eine Fernmetastasierung in Leber, Lunge, Knochen und Myokard erfolgt nur bei ca. 3,5% der Patienten [40], [58]. Intrapenile knotige Satellitenbildung des Primärtumors ist ein Zeichen eines aggressiven Phänotyps und fortgeschrittenem Tumorwachstums [59].

Klinisch wird das Peniskarzinom durch die UICC (Union internationale contre le cancer, Genf) nach dem TNM-System eingeteilt [60]. Dabei ist besonders die Unterscheidung des Tumors in T1a und T1b durch Gefäßinvasion und Differenzierung erwähnenswert, da dies prognoserelevant ist [61].

<u>TNM-Klassifikation nach UICC</u>		
T-Primärtumor (Tumorgröße)	Tcis	Carcinoma in situ
	Ta	Nichtinvasives verruköses Karzinom
	T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
	T1a	Keine lymphovaskuläre Infiltration, <i>Grading</i> 1 / 2
	T1b	Lymphovaskuläre Infiltration, <i>Grading</i> 3 / 4
	T2	Corpus spongiosum oder Corpora cavernosa infiltriert
	T3	Tumor infiltriert Urethra
	T4	Tumor infiltriert Nachbarorgane
N-regionäre Lymphknoten	N0	Keine inguinalen tumorösen Lymphknoten
	N1	Ein befallener unilateraler Lymphknoten
	N2	Multiple und/oder bilateral mobile inguinale Lymphknotenmetastasen
	N3	Fixierte inguinale Lymphknotenpakete oder pelvine Lymphknoten
pN-Lymphknoten (pathologische Klassifikation)	pN0	Keine tumorösen Lymphknoten
	pN1	Ein befallener unilateraler Lymphknoten
	pN2	Multiple und/oder bilaterale inguinale Lymphknotenmetastasen
	pN3	Pelvine Lymphknotenmetastasen oder extranodale Tumorausbreitung in inguinalen Lymphknoten
M-Fernmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen

	M1	Fernmetastasen
--	----	----------------

1.2.3 Therapiemöglichkeiten

Die Therapie des PSCC richtet sich nach dem Stadium der Erkrankung. Nur bei lokalisiertem Primärtumor ohne metastatische Absiedlung, oder eventuell im Stadium der frühen lymphogenen Metastasierung besteht ein kurativer Therapieansatz [62]. Die Therapie bei lokalem Tumorwachstum ist die umgehende chirurgische Entfernung des Primärtumors und der beteiligten Lymphknoten [63]. Im Zuge dessen sollte bei allen Patienten eine invasive Diagnostik der inguinalen Lymphknoten durchgeführt werden [64]. Die Art dieser Diagnostik richtet sich dabei nach dem klinischen Erscheinungsbild der Lymphknoten [62]. Die inguinalen Lymphknoten werden klinisch unterteilt in „*nicht palpable, unauffällige Lymphknoten*“, „*palpable, verschiebbliche Lymphknoten*“ und „*vergrößerte, fixierte Lymphknoten*“ [63]. Bei den nicht palpablen und den palpablen, verschiebblichen Lymphknoten ist nach durchgeführtem Staging eine ipsilaterale, radikale inguinale Lymphadenektomie mit erweitertem Präparationsfeld angezeigt [62], [64]. Dieses rigorose Vorgehen ist Ausdruck eines Hauptproblems in der Therapie des Peniskarzinoms. Die Vorhersagbarkeit für Lymphknotenmetastasen beträgt durch klinische Untersuchung nur ca. 50 % und- selbst bei nicht palpablen, unauffälligen Lymphknoten liegen bereits bei bis zu 25 % der Patienten Mikrometastasen vor [65], [66]. Dem entgegen steht die Tatsache, dass die Rate von postoperativen Komplikationen mit 50 % vergleichsweise hoch ist [67]. Dabei stehen besonders Wundheilungsstörungen und Lymphödeme im Vordergrund, die bei bis zu 30 % der Patienten eine weitere Therapie notwendig werden lassen [67]. Eine frühzeitige Erkennung der Patienten mit inguinalen Lymphknotenmetastasen ist also ein Hauptziel aktueller Forschungen. Sollten bei der inguinalen Lymphadenektomie Lymphknoten von Tumorzellen befallen sein, muss eine adjuvante Zytostatikatherapie (außer bei einer einzelnen Mikrometastase) und eventuell eine pelvine Lymphadenektomie angeschlossen werden [62]. Die Patientengruppe mit den vergrößerten, fixierten Lymphknoten sollte, nach Operation des Primärtumors, einer taxanhaltigen neoadjuvanten Zytostatikatherapie zugeführt werden [63]. Eine Heilung kann durch dieses Vorgehen zwar meist nicht erreicht werden, jedoch ist eine Verlängerung

der medianen Gesamtüberlebenszeit möglich [68]. Außerdem ergibt sich bei gutem Ansprechen der neoadjuvanten Zytostatikatherapie die therapeutische Möglichkeit einer Salvagelymphadenektomie mit anschließender adjuvanter Zytostatikatherapie [68]. In einigen Fällen konnte dadurch sogar ein Langzeitüberleben der Patienten erreicht werden [68]. Bei Behandlungskompromissen, wie beispielsweise der Surveillance Strategie, wird nach Therapie des Primärtumors bei den nicht palpablen, unauffälligen Lymphknoten eine Nachsorge mit klinischer Überwachung durchgeführt. Dieses Vorgehen ist aufgrund deutlich kürzerer 5-Jahresüberlebensraten der Patienten (35% gegen 85 %) als sehr kritisch zu betrachten [69].

Der kurative Ansatz der Zytostatikatherapie beschränkt sich aktuell auf die Kombination mit chirurgischem Vorgehen bei regionalen Lymphknotenmetastasen oder allenfalls bei minimaler systemischer Metastasierung [68]. Andernfalls besteht die Indikation für eine palliative Zytostatikatherapie [68]. Die aktuelle Situation der zytostatischen Therapie des Peniskarzinoms in Deutschland ist extrem unbefriedigend. Durch geringe Fallzahlen entsteht ein Mangel an klinischer Erfahrung, sowie an Daten aus großen randomisierten Studien [70]. Dadurch existiert eine Vielzahl an eingesetzten Schemata, die durch teilweise geringe Ansprechraten und hohe Nebenwirkungspotentiale gekennzeichnet sind [71]. Die häufigste Kombination war dabei in der Vergangenheit das Dexeus-Schema mit Cisplatin, Bleomycin und Methotrexat. Außerdem wurden Kombinationen von Pizocarbo mit Vinblastin, Bleomycin und Methotrexat und teilweise nur Cisplatin und 5-Fluoruracil eingesetzt [71]. Neuere Substanzen aus der Gruppe der Taxane zeigten in mehreren Studien gute Ansprechraten bei Patienten mit Peniskarzinom [72], [73]. Daher erfolgte 2014 durch die Arbeitsgemeinschaft Urologische Onkologie der deutschen Krebsgesellschaft eine generelle Empfehlung zum Einsatz eines Therapieschemas mit der Dreifachkombination aus Paclitaxel, Cisplatin und 5-Fluoruracil [74].

1.2.4 Prognose

Der stärkste prognostische Faktor für das Überleben der Patienten ist das Vorhandensein von inguinalen Lymphknotenmetastasen [39], [40]. Statistisch zeigt sich nach Therapie ein 5-Jahresüberleben von 85-100% bei pathologisch negativen, und von 16-45% bei pathologisch positiven inguinalen Lymphknoten [43], [75]. Die Entstehung von Fernmetastasen bedingt ein durchschnittliches Überleben von 7 bis 10 Monaten [40].

Histologische prognostische Marker für die lymphogene Metastasierung sind das Vorkommen von perineuraler Tumorinvasion (PNI), lymphatisch-venöser Invasion und das histologische Tumorgrading [54]. Eine andere Studie zeigte ebenso, dass eine lymphogene Metastasierung signifikant mit PNI und geringer Tumordifferenzierung assoziiert ist [76]. Zusätzlich zeigte eine weitere Studie, dass eine Invasion der Lymph- oder Blutgefäße einen signifikanten Prädiktor für eine lymphogene Metastasierung darstellt [61]. Die Invasion der Lymphgefäße tritt dabei gewöhnlich in der Nähe der Invasionsfront des Primärtumors auf. Sie kann jedoch auch in entfernten anatomischen Arealen, wie den *penilen* Fascien, der präputialen / glandulären Lamina propria und dem subepithelialen Bindegewebe der Urethra, auftreten [77]. Der Einsatz von molekularbiologischen Markern zur Prognose ist Gegenstand aktueller Forschung. Diese Marker werden jedoch im klinischen Alltag noch nicht verwendet. Zusammenfassend zeigt sich die hohe Relevanz der Gefäßinvasion für die Prognose des Patienten.

1.2.5 Molekularbiologie des Peniskarzinoms

Das Wissen über die Kanzerogenese des Peniskarzinoms ist bis heute relativ begrenzt. Da das Vorliegen chronisch entzündlicher Prozesse am Penis als gesicherter Risikofaktor gilt, liegt eine Beteiligung von Entzündungsmediatoren an der Karzinogenese nahe [78]. Bei der Abwehr einer Entzündung produzieren Entzündungszellen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) zur Bekämpfung infektiöser Partikel. Dabei kann aber auch die DNA der eigenen Zellen geschädigt werden [79]. Ein Zusammenhang zwischen dieser DNA Schädigung und dem häufigen Verlust der Heterozygotie des tumorsuppressiven Gens p16 auf dem Chromosom 6, Region 9p21 wird daher vielfach diskutiert [80]. Dabei konnte sogar ein direkter Zusammenhang zwischen dem Verlust des p16-Tumorsuppressorgens und einer häufigeren Metastasierungsrate gezeigt werden [80]. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde bereits beim Pankreaskarzinom gezeigt, wobei dort eine Überexpression von p16 zu einer Abnahme der Lymphknotenmetastasierung im Mausmodell führte [81]. Generell wurde beim Peniskarzinom häufig die Aberration tumorsuppressiver Gene beobachtet. Dazu gehören *loss of heterozygoty* (LOH) in Chromosom 2q, 6p, 8q, 9p, 12q und 17p13 [82]. Onkogene Viren wie das Humane Papillomavirus (Serotyp 16, 18) spielen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des Zervixkarzinoms [83]. Da HPV-DNA in 30 bis 50 % der konventionellen

Plattenepithelkarzinome des Penis nachgewiesen wurde, ist eine Beteiligung an der Karzinogenese dieser Tumorentität durchaus möglich [47], [80], [84]. Die durch HPV verursachten Veränderungen an tumorsuppressiven Genen wie p53, pRB und p16 (durch HPV Onkogen E6/E7) wurden jedoch nur bei einer sehr geringen Anzahl und überwiegend bei basaloiden und warzigen Subtypen nachgewiesen [80]. Die Gewichtung dieser Beteiligung scheint also noch nicht ausreichend geklärt zu sein.

Zusammenfassend ist das Peniskarzinom eine aggressive Tumorentität, die sich durch besonders hohe Letalität bei manifester Lymphknotenmetastasierung auszeichnet [39], [40]. Studien zur Karzinogenese des Peniskarzinoms zeigten den häufigen Verlust des p16-Tumorsuppressorgens mit nachfolgender Aggressivitätssteigerung [80]. Daher ist anzunehmen, dass die Aktivierung des durch p16 regulierten RB/E2F Signalweges maßgeblich an der malignen Progression des Peniskarzinoms beteiligt ist. Im Fokus der Untersuchungen steht der durch RB kontrollierte Transkriptionsfaktor E2F1, welcher insbesondere in fortgeschrittenen Primärtumoren und Metastasen überexprimiert wird [85].

1.3 Der Transkriptionsfaktor E2F1

1.3.1 Der Rb/E2F Signalweg

Das Retinoblastomagen (Rb) wurde erstmals bei der Erforschung retinaler Zellen bei Kindern mit erblichem Retinoblastom beschrieben. Rb gehört zu der Gruppe der sogenannten „*pocket-protein-family*“. Diese Proteinfamilie zeichnet sich durch Proteinbindungstaschen zur Interaktion mit anderen Proteinen aus [86]. Ursprünglich wurde Rb als Tumorsuppressor betrachtet, dessen Hauptaufgabe der Zellzyklusarrest in der G1 Phase durch Bindung der E2F Transkriptionsfaktoren war [87]. Später wurden noch weitere Funktionen beschrieben, wie die Kontrolle der zellulären Differenzierung, die Regulation der Apoptose und der Erhalt der chromosomalen Integrität [86]. Als Tumorsuppressor spielt Rb eine entscheidende Rolle. Es wird bei DNA-Schädigung durch Phosphatasen dephosphoryliert, wodurch es die E2F-Transkriptionsfaktoren bindet und somit inaktiviert [88]. Die Funktionen von Rb als Regulator des Zellzyklus und als Tumorsuppressor ist in vielen Tumorzellen häufig nicht mehr gegeben [89]. Die Gründe für die Inaktivierung von Rb sind dabei vielseitig. Beim Zervixkarzinom, dem Plattenepithelkarzinom im Kopf/Halsbereich und auch dem Peniskarzinom wurde

beispielsweise eine funktionelle Inaktivierung durch das HPV-E7 Onkogen beobachtet [80], [90], [91]. Des Weiteren wurde ein *loss of heterozygosity* in dem Rb-Gen nachgewiesen [92]. Außerdem kann ein Verlust inhibierender Proteine der Cyclin-D und *Cyclin-dependent kinase 4* (CdK 4), sowie Cyclin-E und *Cyclin-dependent kinase 2* (CdK 2) Komplexe zur Phosphorylierung von Rb führen [89]. Als Inhibitoren von CdK2 und CdK4 wurden p16, p21, p27 und p57 beschrieben [89]. Die Phosphorylierung des Rb-Proteins bewirkt die Freisetzung und Aktivierung der E2F Transkriptionsfaktoren (siehe Abb. 2) [93]. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren umfasst acht Mitglieder, wobei sie hinsichtlich der Transkription von Zielgenen als Aktivatoren (E2F1, E2F2 und E2F3a) oder Repressoren (E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7 und E2F8) klassifiziert werden [89]. Die DNA-Bindung, Interaktion mit Dimerisierungspartnern und Transaktivierung wird dabei von mehreren funktionell unterschiedlichen Domänen am E2F-Protein vermittelt. An der Transaktivierungsdomäne erfolgt die Interaktion mit Rb oder CREB (*cAMP-response element-binding-protein*) [94]. Das Zusammenspiel dieser aktivierenden und repressiven E2F's und dem Rb reguliert in nicht entarteten Zellen den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus [89]. Außerdem wurde beschrieben, dass E2F1 die Fähigkeit zur Einleitung der p53-abhängigen und der p53-unabhängigen Apoptose bei DNA Schädigung besitzt [95]. Bei mehreren Tumorentitäten wurde nun jedoch eine deutliche onkogene Funktion des E2F1, sowohl in präklinischen, als auch in klinischen Studien beobachtet [85], [96]–[99]. Der Transkriptionsfaktor E2F1 scheint also deutlich facettenreicher zu sein als ursprünglich angenommen. Die Tumorsupressorfunktion von E2F1 variiert dabei wohl stark zellkontextabhängig. Dies gilt insbesondere für fortgeschrittene Tumorzellen [85].

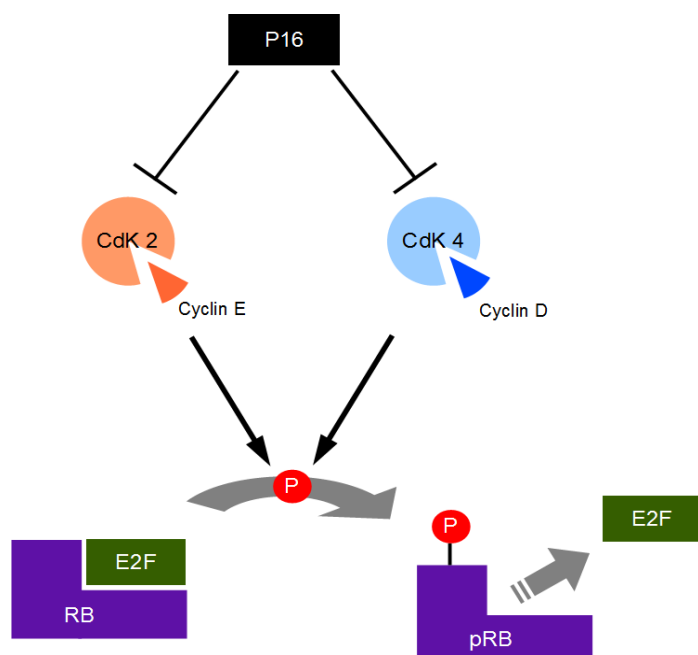


Abb. 2: Schematische Darstellung des Rb/E2F Signalweges. Rb wird durch die Phosphorylierung von CdK2/CyclinE und CdK4/CyclinD inaktiviert, wodurch die E2F-Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Das p16 Tumorsuppressorprotein hemmt die CdK-Cyclin Komplexe. Modifiziert nach „Emerging roles of E2F1 in cancer, Hui-Zi Chen, 2009.

1.3.2 Onkogene Eigenschaften von E2F1

In Bezug auf den Transkriptionsfaktor E2F1 vollzog sich in den letzten Jahren ein Paradigmenwechsel [85]. Ursprünglich wurde E2F1 als ein Initiator des Zellzyklus angesehen. Dabei heterodimerisiert E2F1 mit DP Proteinen um Zellzyklus-relevante Gene zu aktivieren und kontrolliert somit den Übergang von der G1-Phase zur S-Phase [100]. Durch die Experimente von Chen et al. im Mausmodell offenbarte sich, dass der Verlust von E2F1-3 nicht zu einem Zellzyklusarrest führte, da diese Funktion von dem Transkriptionsfaktor Myc kompensiert wurde [101]. Außerdem zeigten die E2Fs eine unerwartete Apoptose-verhindernde Aktivität [101]. Ähnliche Ergebnisse wurden kurz darauf von Chong et al. beschrieben, sodass E2F1 weiter in das Zentrum der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit rückte [102]. Aktuell geht man von einem zellkontextabhängigen Verhalten von E2F1 in malignen Läsionen aus, das sich teilweise dramatisch von dem in gesundem Gewebe unterscheidet [85].

1.3.2.1 E2F1 Beteiligung an invasivem Wachstum und Metastasierung

Eine hohe E2F1 Expression wird generell in vielen malignen Tumorentitäten beobachtet [85]. Ein klinischer Zusammenhang besteht dabei beispielsweise zwischen der E2F1 Expression und dem Auftreten von invasivem Wachstum beim Blasenkarzinom [103]. Außerdem wurden E2F1 Promoterbindungsstellen überaus häufig an Genen beobachtet, die für invasives Wachstum bekannt sind [85]. Eine physiologische Steigerung der Migrationsfähigkeit durch den RB/E2F Weg wurde zudem bei der Entwicklung von Nervenzellen in der Organogenese beobachtet [104], [105]. Dabei wurde eine proliferationsunabhängige Steigerung der Migrationsfähigkeit durch das ebenfalls aktivierende E2F3 vermittelt [105]. Die Rolle von E2F1 scheint sich also auch auf eine Steigerung der Migrationsfähigkeit zu erstrecken, die bei Tumorzellen möglicherweise eine Metastasierung begünstigen könnte. Diese Annahme wurde durch *in-vivo* Experimente mit Melanomzellen bestätigt [97]. Dabei wurde eine deutliche Reduktion pulmonaler Metastasen nach i.v. Injektion von E2F1 Knockdown Zelllinien beobachtet. Außerdem zeigte sich bei *in-vitro* Versuchen eine Invasivitätsminderung bei E2F1-Knockdown, der nicht zu einer Beeinflussung der Proliferation führte [97]. Als Grund für diese E2F1-abhängige Tumorprogression im malignen Melanom wurden die direkte Transaktivierung und die daraus resultierende verstärkte Expression des *Epidermal Growth Factor*

Receptors (EGFR) beschrieben. Daraus resultiert wiederum eine Induktion der MAPK-, ERK-, und PI3K/AKT Signalkaskaden [97]. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass über die Zellinvasion und Zellmigration hinaus E2F1 an weiteren metastasierungsfördernden Prozessen beteiligt ist, wie beispielsweise der Tumorzellextavasation [32]. Dabei konnte in einem *xenograft* Mausmodell eine Steigerung oder Minderung der Lebermetastasierung durch E2F1-Überexpression oder -Knockdown in zirkulierenden Tumorzellen erzielt werden [32]. Der direkt durch E2F1 regulierte Rezeptor RHAMM (*receptor for hyaluron-mediated motility*) ist maßgeblich an diesem Prozess beteiligt, da er als Koaktivator von E2F1 die Fibronektin-Expression reguliert [32]. Fibronektin induziert wiederum einen Umbau der Zellstruktur mit nachfolgender Motilitätssteigerung [106]. Ein weiterer Prozess bei dem E2F1 im Rahmen der Metastasierung eine Rolle spielt, ist die Neubildung von Gefäßen. Vor kurzem konnte in einem *in-vitro* Modell eine E2F1-vermittelte Induktion von Angiogenese in Tumorzellen beobachtet werden [98]. Diese Neubildung von Gefäßen wurde durch die VEGFR-3 und VEGF-C Proteine ausgelöst, die für ihre Beteiligung an Lymphangiogenese bekannt sind [107]. E2F1 reguliert die Expression beider Gene direkt. Außerdem wird unter Einbeziehung eines positiven Rückkopplungsmechanismus E2F1 durch VEGFR-3 wiederum aktiviert [98]. Dieser Rückkopplungsmechanismus resultiert zudem in einer Erhöhung der Expression des Wachstumsfaktors PDGF- β [98]. Neben der Bildung von Lymphgefäßen zeigte sich in anderen Versuchen sogar eine direkte VEGFR-3 und VEGF-C vermittelte Steigerung der Zellmotilität und Invasivität durch Expression des Zelladhäsionsproteins *contactin-1* [108]. Ein klinischer Zusammenhang zwischen einer starken VEGFR-3 und VEGF-C Expression und einem geringen Patientenüberleben wurde zudem mehrfach beobachtet [109]–[111]. So zeigten beispielsweise immunhistochemische Untersuchungen von Endometriumkarzinomproben eine signifikante Korrelation zwischen VEGFR-3-Expression und Tumorstadium, sowie ein deutlich kürzeres rezidivfreies Überleben bei hoher VEGFR-3-Expression [110]. Eine andere Untersuchung zeigte, dass bei Präparaten des kolorektalen Karzinoms ein signifikanter Zusammenhang zwischen hoher VEGFR-3-Expression und verkürztem Patientenüberleben besteht [111].

Zusammenfassend zeigten diese Experimente eine E2F1-vermittelte Steigerung der Migrationsfähigkeit und Invasivität von Krebszellen durch verschiedene Mechanismen. Es existieren zudem Hinweise auf eine direkte Regulation der Schlüsseldgene der EMT durch

E2F1. So konnte durch einen E2F1-Knockdown in Melanomzellen eine Expressionssteigerung von E-Cadherin beobachtet werden [97]. Eine direkte Verbindung zwischen E2F1 und der Einleitung der EMT als wichtigem Schritt bei der Metastasierung ist somit durchaus möglich.

1.3.2.2 E2F1 und Zytostatikaresistenz

E2F1 führt ähnlich wie p53 bei DNA-Schädigung zur Induktion der Apoptose [112]. Demzufolge hätte eine hohe E2F1 Expression bei Tumorpatienten ein gutes Ansprechen auf eine zytostatische Behandlung nach sich ziehen müssen. In einigen klinischen Studien wurde jedoch häufig auch das genaue Gegenteil nachgewiesen. Häufig korrelierten hohe E2F1 Expressionen eher mit einem schlechten Patientenüberleben bei Zytostatikatherapie [113]. Die Mechanismen für diese E2F1-vermittelte Zytostatikaresistenz sind vielfältig [96]. Eine beschriebene Möglichkeit ist die E2F1 induzierte Expression von p73 und dem N-Terminal-trunkierten DNp73 [114]. Diese Proteinisoform vom Wildtyp p73 besitzt durch alternatives Spleißen oder Transkription von einem alternativen Promotor keine N-terminale Transaktivierungsdomäne mehr [114]. Die funktionelle Konsequenz daraus ist, dass diese Isoform von p73 die Volllängenform von p73 und das p53 Protein antagonisiert [115]. Eine hohe DNp73 Expression wurde dabei mit einem schlechten Ansprechen auf Zytostatika assoziiert [114]. Ein weiterer möglicher Signalweg wurde in Melanomzellen entdeckt, bei dem die MicroRNA 205 (miR-205) als Ziel von p73 identifiziert wurde [116]. Dabei inhibiert p73 direkt miR-205, welches die für Zytostatikaresistenz bekannten *ATP-binding cassette transporters A2 / A5* (ABCA2/5) und das Bcl-2 Protein inhibiert [116].

Zusammenfassend ist E2F1 ein sehr interessanter Transkriptionsfaktor, der offenbar in dereguliertem Zustand seine ursprüngliche tumorsuppressive Wirkung einbüßt. Infolgedessen überwiegt das onkogene Potential dieses Faktors. Dabei werden durch E2F1 mehrere Wachstumsfaktoren und Signalkaskaden aktiviert, die die maligne Progression des Tumors vorantreiben. Dazu gehören unter anderem die Steigerung des invasiven Wachstums und die Ausbildung einer Zytostatikaresistenz. Diese Prozesse sind dabei nicht mehr von der Proliferation abhängig [85]. Eine direkte Regulation der EMT durch E2F1 konnte bis jetzt jedoch noch nie nachgewiesen werden. Eine Beteiligung daran ist aber aufgrund jüngster Erkenntnisse durchaus wahrscheinlich.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Das Peniskarzinom ist eine in den Industrienationen überaus seltene Tumorentität [42], die sich durch eine hohe Zytostatikaresistenz und schlechte Prognose nach Lymphknotenmetastasierung auszeichnet [68]. Die Identifizierung der Patienten mit inguinalen Lymphknotenmetastasen zur nachfolgenden Lymphadenektomie stellt einen entscheidenden Schritt in der Therapie des Peniskarzinoms dar [65], [66].

Im metastasierten Peniskarzinom wurde häufig ein Verlust des p16 Tumorsuppressorgens beobachtet [80]. Daher ist es durchaus naheliegend, dass der RB/E2F Signalweg insbesondere während der Metastasierung aktiviert wird. Darüber hinaus stellt sich die Frage, welchen Einfluss diese Deregulation auf den Tumorphänotyp hat. Für diese Untersuchung standen erst kürzlich etablierte Peniskarzinomzelllinien zur Verfügung [117]. Diese wurden 2013 als weltweit erstes *in-vitro* Zellkulturmodell des Peniskarzinoms etabliert [117].

Das Ziel dieser Arbeit ist die vergleichende Analyse des RB/E2F Signalweges in Peniskarzinomzelllinien, die ursprünglich sowohl aus Primärtumoren als auch Lymphknotenmetastasen etabliert wurden. Darüber hinaus soll untersucht werden, inwiefern die Invasivität und Zytostatikaresistenz durch die Aktivität von E2F1 in diesen Zelllinien beeinflusst wird. Im Einzelnen beinhaltet das auch, ob und inwiefern E2F1 im Peniskarzinom die EMT reguliert.

Zusammenfassend ergeben sich daraus folgende Zielstellungen:

- Ist der Transkriptionsfaktor E2F1 an der malignen Progression und der Zytostatikaresistenz des metastasierten Peniskarzinoms beteiligt?
- Sind klassische EMT-Marker nachweisbar und besteht ein Zusammenhang mit E2F1?
- Welche molekularen Marker eignen sich möglicherweise für umfangreiche Untersuchungen von Patientenproben zur Identifizierung von Markern zur Prädiktion von inguinalen Lymphknotenmetastasen?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Die unten aufgelisteten und in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien des Peniskarzinoms, wurden uns vom Institut für Urologie und Pädiatrische Urologie des Universitätsklinikums Kiel (Schleswig-Holstein) übergeben.

<u>Name</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Medium</u>
PeCa	Humane <i>penile</i> Primärtumorzelllinie	KGM
PeCa-D	Humane <i>penile</i> Primärtumorzelllinie	KGM
KiLk-D	Humane <i>penile</i> Lymphknotenmetastasenzelllinie des Primärtumor PeCa-D	RPMI + 10% FBS
KiLk-K	Humane <i>penile</i> Lymphknotenmetastasenzelllinie	RPMI + 10% FBS
VH-6	Humane nicht-transformierte Vorhautfibroblastenzelllinie	DMEM + 10% FBS

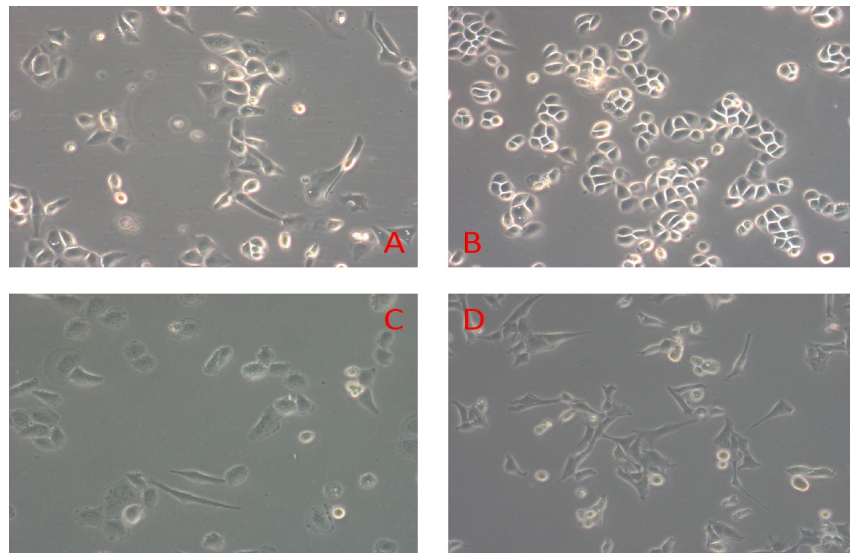


Abb. 3: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Peniskrazinomzelllinien (200x Vergrößerung). Man beachte das überwiegend epitheliale Erscheinungsbild mit abgerundeten, eng gruppierten Zellverbänden, besonders gut zu sehen in den Primärtumoren (A u. B). Die Lymphknotenmetastasen erscheinen im Gegensatz dazu eher fibroblastisch (C u. D), die Zellen wirken spitz, gestreckt und sind weniger eng miteinander verbunden. A) PeCa, B) PeCa-D, C) KiLk-D, D) KiLk-K

2.1.2 Chemikalien

Die Materialien wurden teilweise über die Apotheke der Universität Rostock (Zentrallabor des Klinikums, Ernst-Heydemann-Strasse 7, 18057 Rostock) dosiert und abgefüllt.

2.1.2.1 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Cisplatin 1 mg/ml unverdünnt	Teva (Israel, IL)
Paclitaxel 6 mg/ml unverdünnt	Medac (Hamburg, D)
5-Fluoruracil 50 mg/ml unverdünnt	Ribosepharm (Gräfelfing, D)
1M Dithiothreitol	AppliChem (Darmstadt, D)
1M NaF (NatriumFluorid)	Sigma-Aldrich (München, D)
Ammonium persulfate Solution 30%	Sigma-Aldrich (München, D)
Amphotericin B (P11-001)	GE Healthcare (Chalfont St Giles, GB)
Bradford (Bio-RAD-Protein Assay, 500-0006)	Bio-Rad (München, D)
Clarity Western ECL-substrate (Peroxid+Luminol/Enhancer)	Bio-Rad (München, D)
cOmplete Protease Inhibitor (11697498001)	Roche (Mannheim, D)
DAPI BioChemicaBC	AppliChem (Darmstadt, D)
Ethanol 70%	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Fetal Bovine Serum (S0115)	Biochrome AG (Berlin, D)
Isopropanol	Walter-CMP GmbH & Co. KG (Kiel, D)
Matrigel® Matrix, Basement Membrane, REF 356234	Corning® (New York, USA)
MEM Non Essential Amino Acids (100x) GE Healthcare(M11-003)	Sigma-Aldrich (München, D)
Non-Reducing Lane Marker Sample Buffer (39001)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Page-Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Penicillin Streptomycin (P433-100ML)	Sigma-Aldrich (München, D)
PhosStop Easypack (04906845001)	Roche (Mannheim, D)
Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Propidium-Iodid-Solution (1,0mg/ml in	Sigma-Aldrich (München, D)

H ₂ O, P4864-10ml)	
Puromycin (500mg, P15-019)	PAA (Cölbe, D)
RNase-A 17,500 Units (R42/43,S23-24-26-36/37)	Qiagen GmbH (Hilden, D)
RotiphoreseGel 40% Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Sodiumorthovanadate	Santa Cruz (Dallas, USA)
Super-Signal West femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Temed	Bio Rad (München, D)
Trypanblau	Carl Roth (Karlsruhe, D)
TurboFect Transfection Reagent	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Tween 20	Bio Rad (München, D)

2.1.2.2 Lösungen und Puffer

Beschreibung	Inhaltstoffe	Hersteller
10x Sodium Dodecyl Sulfat Buffer (Laufpuffer)	30 g Trisaminomethane 144 g Glycin 10 g SDS Pellets 1 l Auqa dest.	Serva (Heidelberg, D) Carl Roth (Karlsruhe, D) Carl Roth (Karlsruhe, D)
10x Tris-Buffered Saline Buffer (mit Tween 20)	24,2 g Trisaminomethane 80 g NaCl (1 ml Tween 20) 1 l Auqa dest.	Serva (Heidelberg, D) Bio-RAD (München, D) Bio Rad (München, D)
5% Milchlösung	2 g Milchpulver 400 ml TBST	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Blotbuffer	5,82 g Trisaminomethane 2,93 g Glycin 200 ml Methanol 800 ml Auqa dest.	Serva (Heidelberg, D) Carl Roth (Karlsruhe, D) J.T.Baker® Chemicals (Center Valley, USA)
PBS (Dulbecco's Phosphate Bufferd Saline, D8537)	0,2 g/l KCl 0,2 g/l KH ₄ HPO ₄ 8,0 g/l NaCl 1,44 g/l Na ₂ HPO x 7H ₂ O	Sigma-Aldrich (München, D)

	ad 1 l Aqua. dest. pH 7,2-7,4	
Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA)	0.5 ml Trisaminomethane 1 M pH 7,2 3 ml 5 M NaCl 0,5 ml SDS 20% 1 g Natriumdeoxycholat 1 ml Triton x 100 Sigma Ultra 90,5 ml Aqua dest	Serva (Heidelberg, D) Carl Roth (Karlsruhe, D) Carl Roth (Karlsruhe, D) Applichem (Darmstadt, D) Sigma-Aldrich (München, D)
Stripping Buffer	15 g Glycin 1 g SDS Pellets 10 ml Tween 20 HCl bis zum pH-Wert von 2,2 zugeben	Carl Roth (Karlsruhe, D) Carl Roth (Karlsruhe, D) Bio-RAD (München, D) J.T.Baker® Chemicals (Center Valley, USA)
Trypsin (1x) Gamma irradiated (59428C-100ML)	0,25% Porcin Trypsin (1:250) in HBSS 0,02 EDTA-2Na	Sigma-Aldrich (München, D)

2.1.2.3 Wachstumsmedien der Zellkulturen

<u>Beschreibung</u>	<u>Zusätze (Hersteller s.o.)</u>	<u>Hersteller</u>
DMEM High Glucose (4,5 g/l, with L-Glutamine, E15-810)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 % Fetal Bovine Serum • 0,5% Amphotericin B • 1 % Penicillin Streptomycin • 1 % MEM Non Essential Amino Acids 	Sigma-Aldrich (München, D)
Keratinocyte Growth Medium 2 (Ready to use, C-20011)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5% Amphotericin B • 1 % Penicillin Streptomycin • Supplement Mix (C-39016) 	PromoCell (Heidelberg, D)

	<ul style="list-style-type: none"> • CaCl Solution (C-34006) 	
RPMI 1640 (with L-Glutamine, E15-840)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 % Fetal Bovine Serum • 0,5% Amphotericin B • 1 % Penicillin Streptomycin • 1 % MEM Non Essential Amino Acids 	Sigma-Aldrich (München, D)

2.1.3 Antikörper

<u>Primärantikörper</u>	
<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
Kaninchen-anti-CdK-2-Antikörper (M2,sc-163, polyklonal)	Santa Cruz (Dallas, USA)
Kaninchen-anti-CdK-4-Antikörper (C22,sc-260, polyklonal)	Santa Cruz (Dallas, USA)
Kaninchen-anti-Cyclin-D1-Antikörper (C-20,sc-717, polyklonal)	Santa Cruz (Dallas, USA)
Kaninchen-anti-E-Cadherin-Antikörper (24E10, monoklonal)	Cell Signaling (Boston, USA)
Kaninchen-anti-pRB-Antikörper (ser780,#93075)	Cell Signaling (Boston, USA)
Kaninchen-anti-Slug-Antikörper (H-140,sc-1539, polyklonal)	Santa Cruz (Dallas, USA)
Kaninchen-anti-VEGF-C-Antikörper (H190,sc-9047, polyklonal)	Santa Cruz (Dallas, USA)
Kaninchen-anti-VEGF-Rezeptor-1-Antikörper (#2893S, polyklonal)	Cell Signaling (Boston, USA)
Kaninchen-anti-VEGF-Rezeptor-3-Antikörper (C-20,sc-321, polyklonal)	Santa Cruz (Dallas, USA)
Maus-anti-Cyclin-E-Antikörper (HE12,sc247, monoklonal)	Santa Cruz (Dallas, USA)
Maus-anti-E2F1-Antikörper (KH95, monoklonal)	Santa Cruz (Dallas, USA)

Maus-anti-HIF-1 α (Cat.610958, polyklonal)	BD (Heidelberg, D)
Maus-anti-N-Cadherin-Antikörper (Lot.17668, Cat.610921, polyklonal)	BD (Heidelberg, D)
Maus-anti-p53-Antikörper (Pab 240, Epitop Aminosäuren 156-214, detektiert mutiertes und Wildtyp p53)	BD (Heidelberg, D)
Maus-anti-p53-Antikörper (Pab1620, detektiert nur Wildtyp p53)	EMD Millipore (Darmstadt, D)
Maus-anti-RB-Antikörper (4H1, monoklonal)	Cell Signaling (Boston, USA)
Maus-anti- β -Aktin-Antikörper (A1978)	Sigma-Aldrich (München, D)
Maus-anti-Vimentin-Antikörper (sc-6260,E1004, monoklonal)	Santa Cruz (Dallas, USA)
Ziege-anti-RHAMM (E-19,sc-16170, polyklonal)	Santa Cruz (Dallas, USA)
<u>Sekundärantikörper</u>	
<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt)	Cell Signaling (Boston, USA)
Ziege anti-Maus IgG-Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt)	Cell Signaling (Boston, USA)
Kaninchen anti-Ziege IgG-Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt)	Cell Signaling (Boston, USA)

2.1.4 Plasmide

<u>Expressionsvektor</u>	<u>Hersteller</u>
pcDNA3.1 control	cDNA-Expressionsvektor, hier Leervektor als Kontrolle (Invitrogen, Karlsruhe)
pCMVE2F-1	Laboreigener E2F1 Expressionsvektoren basierend auf pcDNA 3.1

2.1.5 Virale Vektoren

<u>Adenovirale Vektoren</u>	<u>Zielstruktur</u>
Ad. GFP	Vektor exprimiert das unter blauem bis ultraviolettem Licht grünlich fluoreszierende Protein GFP
Ad.sh. GFP (control)	Vektor exprimiert eine gegen GFP gerichtete sh.RNA
Ad.sh. E2F1	Vektor exprimiert eine gegen E2F1 gerichtete sh.RNA
<u>Lentivirale Vektoren</u>	<u>Zielstruktur</u>
Lv.sh. control. (SHC002)	Lentiviraler Expressionsvektor ohne genetische Zielstruktur zur Negativkontrolle
Lv.sh. E2F1 #1 (sh.TRCN-250)	Lentiviraler Vektor zur stabilen Expression einer gegen E2F1 gerichteten sh.RNA*
Lv.sh. E2F1 #2 (sh.TRCN-253)	Lentiviraler Vektor zur stabilen Expression einer gegen E2F1 gerichteten sh.RNA*

* *sh.TRCN-250 und sh.TRCN-253 sind jeweils gegen eine unterschiedliche Zielsequenz in der E2F1 mRNA gerichtet.*

2.1.6 Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien

<u>Instrumente</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
<i>Agitateur magnetique Chauffant 10517</i>	Magnetrührgerät	Fisher Bioblock Scientific (Schwerte, D)
Amersham Hyperfilm ECL (Highperformance Chemiluminescence Film)	Fotofilm für Westernblot	GE Healthcare (Chalfont St Giles, GB)
AxioCam ICc 1	Kameraoptik für Fotoaufnahmen	Carl Zeiss GmbH (Oberkochen, D)
Axiovert 25	Mikroskop	Carl Zeiss GmbH (Oberkochen, D)
Binder CO2-Inkubator (Serie CB150)	Zellinkubator	Binder GmbH (Tuttlingen, D)

Biosphere Filter Tips (0,5-10ul,2-100ul,100-1000ul)	Einmal Plastikpipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Cell Culture Inserts, 6 Well format PET-trached membrane, 8.0µm pore size, REF 353093	Perforierte Inserts des Boyden-Chamber-Assay für 6 Well Zellkulturschalen	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Celloshaker (Variospeed, Variotime)	Schüttelgerät für Westernblot	Renner (Dannstadt, D)
Cellstar Cell-Culture Dishes, PS, (145x20mm,100x20mm,60x15mm)	Zellkulturschalen	Greiner-Bio-One (Kremesminster, A)
Cellstar® TC-Plate,48 Well, sterile, No.677180	48 Well, Zellkulturschalen	Greiner-Bio-One (Kremesminster, A)
Chromatographiepapier	Abdichtungspapier für Westernblot	Whatman International (Springfield Mill, UK)
Curix 60	Filmentwicklungsgerät	AGFA–Gevaert N.V. (Mortsel, BE)
Deckgläser 20x26mm	Deckgläser für Zählkammer	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Eppendorf Bio-Photometer mit DPU 414 Thermal Printer	Photometer für Bradford-Test	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf Centrifuge 5415D	Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf Gefäße (Safe Lock Tubes, 1,5ml, 2ml)	Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf Research Pipetten (0,5-10ul,2-100ul,100-1000ul)	Pipetiergeräte	Eppendorf (Hamburg, D)
FACS Calibur	Durchflusszytometriegerät	BD (Heidelberg, D)
Falkon Cellstar-Tubes (15ml, 50ml,PP, steril)	Reaktionsgefäß	Greiner-Bio-One (Kremesminster, A)

Finnpipette	Pipetiergerät	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Flow Cytometry Röhren (Ref.55.1579)	Reaktionsgefäß für FACS-Messung	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
HeraSafe (Sicherheitswerkbänke Klasse II Typ H)	Werkbank für Zellkulturarbeiten	Heraeus (Hanau, D)
Hyband ECL Membran, Nitrocellulose Blotting Membrane	Membran für Western Blot	Amersham Bioscience (Freiburg, D)
mbq 52 ac	UV-Lampe	Leistungselektronik Jena GmbH (Jena, D)
Microplate Reader Benchmark	Photometer zum Messen der Lichtabsorption in 96 Well Platten	Bio-Rad (München, D)
Mini Protean II	SDS-Gel Laufkammer	Bio-Rad (München, D)
Mini Protean Tetra System	Western Blot Blottkammer	Bio-Rad (München, D)
Multifuge 3 L-R Zentrifuge	Zentrifuge für Zellkulturarbeiten	Heraeus (Hanau, D)
Multiwell™ 6 Well, sterile, 353502	6 Well, Zellkulturschalen geeignet für Cell Culture Inserts	BD (Heidelberg, D)
Neubauer Zählkammer (0,100mm Tiefe)	Zählkammer für Bestimmung der Zellzahl	Optik Labor (Lancing, UK)
Serological Pipette Cellstar (steril, 5ml,10ml,25ml)	Einmal Plastikpipetten	Greiner-Bio-One (Kremesmunster, AU)
Standard Power Pack P25	Spannungsquelle für Western Blot	Biometra (Göttingen, D)
UBD2 Wärmeplatte	Wärmeplatte für Mikroreaktionsgefäße	Grant Instruments (Cambridge, UK)
Ultraschallbad Sonorex (RK 100 H)	Ultraschallbad zur Proteinextraktion	Bandelin Electronic (Berlin, D)
Vortex-Genie 2	Schüttelgerät	Scientific Industries (New

		York, USA)
Zellkultur Testplatten 96F, No.92696	96 Well, Zellkulturschalen	TPP Trasadingen (CH)
Zellspachtel (99010)	Spachtel zur manuellen Zelllösung	TPP Trasadingen (CH)

2.1.7 Kits

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
TACS TM XTT Cell Proliferation Assay	Biozol (Eiching, D)

2.1.8 Verwendete Software

<u>Software name</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Hersteller</u>
AxioVs40, V 4.8.0.0, 2006-2009	Software zum Fotografieren der Zelllinien	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH (Oberkochen, D)
BD Cell Quest TM Pro Version 4.0.2	Messsoftware des FACS-Gerätes	BD (Heidelberg, D)
Cyflogic Version 1.2.1 released 19.11.2008	Analysesoftware für FACS-Daten	©Perttu Terho & ©CyFlo Ltd (Turku, FIN)
Microplate Manager®, Version 5.2 Build 103, 2002	Messsoftware des Microplate Reader Benchmark	Bio-RAD Laboratories (München, D)
Apache OpenOffice TM , Version 3.4.1	Analysesoftwarepaket für statistische Berechnungen	Apache Software Foundation (Delaware, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Protein-Arbeitstechniken

2.2.1.1 Proteinisolierung aus den Zellen

Die Proteine aus eukaryotischen Zellen wurden mithilfe eines lysierenden RIPA Puffers (siehe 2.1.2.2) extrahiert. Dafür wurden die Zellen vorher mit einem Zellspachtel von der Kulturplatte gelöst, bei 1400 rpm (4 °C) für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Pro Zellpellet wurden 75 µl RIPA, 10 µl 10 mM SoV (pH 9,0), 5 µl 1M NaF und 10 µl Proteinase/Phosphataseinhibitor verwendet. Diese Suspension wurde nun bei -20°C ca. 40 min inkubiert. Anschließend wurde das Mikroreaktionsgefäß für 10 min in einem Ultraschallbad auf Eis behandelt. Danach wurden die Proben bei 14000 rpm (4 °C) für 15 min zentrifugiert. Der Überstand, der die extrahierten Proteine enthielt, wurde abgesogen und in neues Mikroreaktionsgefäße überführt.

2.2.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Nach der Proteinisolierung musste die Gesamtproteinkonzentration der Lösung bestimmt werden, um bei weiteren Versuchen die Proteinmengen zu vereinheitlichen. Das Prinzip des Bradford-Tests ist es, die maximale Lichtabsorption des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-250 bei 595 nm Wellenlänge zu messen. Durch vorangegangene Proteinbindung verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm Wellenlänge. Somit kann durch die Absorptionszunahme des Farbstoff-Proteingemisches bei 595 nm Wellenlänge, gegen einen Leerwert verglichen, die Konzentration des Gemisches ermittelt werden. Dazu wurden jeweils in doppelten Ansätzen 1µl der Proteinlösung in 200 µl Bradford Reagenz, 99 µl PBS und 700 µl H₂O gegeben. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Messung mit einem Eppendorf Bio-Photometer durchgeführt.

2.2.1.3 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zur Detektion von Proteinen. Dabei bedient sich dieses Verfahren der elektrophoretischen Auftrennung der denaturierten Gesamtproteine mit anschließender selektiver Visualisierung durch spezifische Antikörper. Der primäre Antikörper bindet an das entsprechende Epitop des Zielmoleküls (Antigen). In einem weiteren Schritt bindet der sekundäre Antikörper an den primären Antikörper. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Enzym konjugiert. Dieses Enzym katalysiert eine chemische Reaktion durch die Chemolumineszenz erzeugt wird. Diese Chemolumineszenz kann photometrisch detektiert werden.

2.2.1.3.1 Herstellung von Polyacrylamidgel

10%ige Acrylamidgele (Trenngel) wurden aus 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 4,9 ml H₂O, 2,5 ml 40 %-Acrylamid und 100 µl SDS hergestellt. Durch Zugabe von 17 µl 30%-Ammoniumpersulfat wurde die Polymerisation der Acrylamidketten initiiert. 6 µl TEMED wirkten bei dieser Reaktion als Katalysator. Die Länge der Polyacrylamidketten ist abhängig von der Acrylamidkonzentration, woraus sich letztendlich die Eigenschaften des Gels ergeben. Je nach Acrylamidkonzentration variieren die Porengröße, die Elastizität und Dichte des Gels. Glaskammern und Deckgläser wurden vorab mit Alkohol gereinigt, fixiert und der 8 cm x 8 cm x 1,5 mm große Zwischenraum zügig mit Trenngel auf eine Höhe von ca. 80 % aufgefüllt. Auf das polymerisierte Trenngel wurde nun mit einer Pipette 500 µl Isopropanol gegeben, damit eine glatte blasenfreie Oberfläche entsteht. Nachdem das Trenngel in der Kammer vollständig polymerisiert war, wurde das Isopropanol abgegossen und Sammelgel in die verbleibenden 20% der Glaskammer gegossen. Das Sammelgel bestand aus 2,5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8), 6,4 ml H₂O, 1 ml 40% Acrylamid und 100 µl SDS. Durch Zugabe von 17 µl 30%-Ammoniumpersulfat und 11 µl TEMED polymerisierte das Gel. Im letzten Schritt wurde der Kamm zur Herstellung der Probestaschen in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Nach vollständiger Polymerisation konnte das Gel verwendet werden.

2.2.1.3.2 SDS Page und Blotten

Zur Vorbereitung der Proteinproben für die Elektrophorese wurde eine definierte Menge an Zelllysat in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und auf 21µl mit H₂O aufgefüllt. Dazu

wurden 3 µl 1M DTT und 6 µl Non-Reducing-Lane-Marker gegeben. Die Proben wurden nun für 10 min bei 95,0 °C denaturiert und anschließend in die Taschen des Sammelgels überführt. Zusätzlich wurden 3 µl Page-Ruler™ Prestained Protein Ladder (Größenstandard) in eine Tasche gefüllt, um die Größe der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer fixiert, welches anschließend mit SDS Laufpuffer (siehe 2.1.2.2) befüllt wurde. Bei 100 Volt betrug die Laufzeit der Proben im Gel abhängig von der gewünschten Auftrennung ca. 2 Stunden. Anschließend wurde das Gel aus der Glaskammer herausgelöst und 10 min in Blotpuffer (siehe 2.1.2.2) auf dem Celloshaker inkubiert. Gleichzeitig wurden Chromatographiepapier (Whatman) und die Nitrocellulosemembran in Blotpuffer inkubiert. Die in dem Gel aufgetrennten Proteine wurden nun mittels Tank-Blotting System auf die Membran übertragen. Nach Abschluss des Blottens wurden das Gel und das Chromatographiepapier verworfen. Die Nitrocellulosemembran wurde für eine Stunde in 5% Milchlösung (siehe 2.1.2.2) inkubiert um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren.

2.2.1.3.3 Nachweis der Proteine mit spezifischen Antikörpern

Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen durch 5% Milchlösung erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht. Der Primärantikörper wurde mit Ausnahme von anti-β-Aktin 1:1000 in 5% Milchlösung verdünnt. Anti-β-Aktin wurde 1:4000 verdünnt. Anschließend wurde der Primärantikörper abgezogen und die Membran 3 mal für jeweils 5 min mit TBST (siehe 2.1.2.2) gewaschen, um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers zu vermeiden. Im Anschluss daran wurde der Meerrettichperoxidase-gekoppelte-Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2500 für 1 Stunde mit der Membran inkubiert. Danach erfolgten erneut zwei Waschgänge mit TBST für jeweils 5 min und ein Waschgang mit TBS für 5min.

Zur Detektion der Immunreaktion wurde das ECL Plus Western Blotting Detection System von Bio-RAD verwendet. Bei diesem System wird Chemolumineszenz nachgewiesen. Die Chemolumineszenz wird durch die antikörpergekoppelte Meerrettichperoxidase erzeugt, die die Umsetzung von Luminol und H₂O₂ zu Dicarboxylat-Dianion katalysiert. Zur Auswertung wurden Amersham Hyperfilm ECL Filme benutzt, die in einer Dunkelkammer kurz auf die mit ECL Western Blotting Substrat ausgesetzten Membran gelegt wurden. Dadurch wurden die hochempfindlichen Filme an den Stellen der Antikörperbindung

belichtet. Anschließend wurden die Filme in dem Entwicklungsautomaten Curix 60 von AGFA entwickelt. Abhängig von der unterschiedlichen Expression der Proteine konnten unterschiedlich stark geschwärzte Banden auf dem Film gezeigt werden. So erhielt man Aufschluss über die relative Höhe der Proteinexpressionen in den einzelnen Proben.

2.2.1.3.4 Einsatz des Stripping Buffers zum Nachweis von β -Aktin

Durch die Tatsache, dass viele untersuchte Proteine ein ähnliches Molekulargewicht wie β -Aktin haben, musste ein Stripping Buffer eingesetzt werden. Nur so konnte bei jedem Blot β -Aktin nachgewiesen werden. Das Prinzip des Stripping Buffers beruht auf einer durch Säure verursachten Denaturierung der zuvor gebundenen Antikörper. Dadurch kann eine neue Inkubation mit einem anderen Antikörper erfolgen. Dazu wurde die Membran 10 min mit Stripping Buffer inkubiert, 2 mal mit TBS und 2 mal mit TBST für jeweils 10 min gewaschen. Anschließend musste die Membran 1 Stunde in 5% Milchlösung inkubieren um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Danach war die Membran bereit, mit einem neuen primären Antikörper inkubiert zu werden.

2.2.2 Allgemeine Arbeitstechniken mit Zellkulturen

2.2.2.1 Passagieren von Zelllinien

Die Inkubation der Zelllinien erfolgte in einem speziell für Zellkulturen vorgesehenem Brutschrank, in dem konstant eine Temperatur von 37°C und ein Gasanteil von 5% CO₂ herrschten. Die Arbeit an Zellkulturen wurde nur unter sterilen Werkbänken mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Die Zelllinien wurden in ausreichend Medium mit Zusätzen (siehe 2.1.2.3) kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS mit 1-2 ml Trypsin ca. 10 min. im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen vorsichtig mit Medium von den Zellkulturschalen abgespült und in Falcon-Gefäße übertragen. Danach erfolgte die Zentrifugation mit 1400 rpm (4 °C) für 10 min. Das so gewonnene Zellpellet wurde daraufhin in Medium resuspendiert. Nun konnte die gewonnene Zellsuspension anteilig auf neue Zellkulturschalen ausgebracht oder für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension ist für die Durchführung der Funktionsassays, sowie für die Transduktion und Transfektion notwendig. Dafür wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau vermischt. Der anionische Azofarbstoff ist für vitale Zellen nicht membrangängig und färbt so nur avitale Zellen blau. Zum Zählen wurden 10 µl dieser Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Es erfolgte die Bestimmung der Anzahl der vitalen Zellen in allen 4 Quadranten. Mithilfe folgender Formel wurde die durchschnittliche Anzahl der Zellen pro Milliliter berechnet.

$$\left(\frac{\text{Summe der 4 Quadranten}}{4} \right) \times 20.000$$

2.2.3 Genetische Modifikation von Zelllinien durch virale Vektoren

Das Prinzip eines Gen-Knockdown beruht auf der Nutzung der sogenannten RNA-Interferenz. Bei der RNA-Interferenz wird eine bestimmte zelleigene mRNA an der Translation gehindert. Somit findet eine posttranskriptionelle Ausschaltung des Gens der mRNA statt. Durch einen adenoviralen Vektor wird eine spezifische doppelsträngige Vorläufer-shRNA in die Zellen eingebracht. Bei einem lentiviralen Vektorsystem erfolgt eine Integration der genetischen Information in das Genom der Wirtszelle. Das Schlüsselenzym dieses Vorganges ist die Reverse Transkriptase. Danach kommt es promotorspezifisch zu einer Transkription der Vorläufer-shRNA im Zellkern. Die Vorläufer-shRNA wird dann im Zytoplasma durch eine zelleigene Endoribonuklease (Dicer) in siRNA umgewandelt. Dabei wird die doppelsträngige RNA in 20 bis 25 Nukleotid lange, doppelsträngige Fragmente zerschnitten. Die siRNA bildet mit Proteinen aus der Argonaut Familie den sogenannten RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*). Innerhalb des RISC-Komplexes wird die doppelsträngige siRNA in Einzelstrang-RNA zerlegt. Der RISC-Komplex bindet nun an die komplementäre mRNA der Zelle. Durch die Anlagerung des Gegenstranges an die Ziel-mRNA wird diese abgebaut. Das Ergebnis dieses Vorgangs ist eine effektive Hinderung der Zelle an der Translation des gewünschten Gens.

2.2.3.1 Adenovirale Transduktion

Die viralen Vektoren zum gezielten E2F1-Knockdown waren in dem Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung bereits vorhanden (siehe 2.1.5). Die adenovirale Transduktion ist ein Verfahren, bei dem shRNA (*small haripin RNA*) mithilfe eines adenoviralen Vektors in eukaryontische Zelle eingebracht wird. Diese shRNA wird durch zelleigene Enzyme in siRNA umgewandelt. Die mithilfe dieser Vektoren eingebrachte genetische Information wird jedoch nicht in das Genom der Zellen integriert oder bei der Zellteilung repliziert. Die Bestimmung des Titers erfolgte im Voraus durch Titration und DNA-Konzentrationsmessung im Photometer bei 260 nm. Daraufhin konnte die benötigte Vektormenge berechnet werden, um eine möglichst hohe Transduktionseffizienz zu erreichen. Die MOI gibt dabei die „multiplicity of infection“ wieder. Das entspricht dem Verhältnis von infektiösen Partikeln pro Wirtszelle. Bei den durchgeführten Transduktionen betrug dieser 5. Das benötigte Vektorvolumen wurde anhand der unten benannten Formel ausgerechnet.

$$\frac{\text{Zellzahl} \times \text{MOI}}{\text{Vektortiter}} = \text{benötigte Vektormenge}$$

Zur Vorbereitung der Transduktion wurden 1×10^6 Zellen auf einer 10 cm Zellkulturplatte in 10 ml Medium ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesogen und die benötigte Vektormenge (in 1 ml Medium verdünnt) zugegeben. Nach ca. 30 minütiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre wurde die Zellkulturplatte mit 10 ml Medium aufgefüllt. Bis zur Ernte inkubierten die Zellen 72 Stunden. Die Effizienz des Knockdowns wurde nachfolgend durch Western Blot bestimmt.

2.2.3.2 Lentivirale Transduktion

Die verwendeten lentiviralen Vektoren wurden mit einer Calcium-Phosphat-Transfektion mit HEK293T-Zellen hergestellt. Mithilfe der lentiviralen Transduktion kommt es zur dauerhaften Integration genetischen Materials, im vorliegenden Falle der genetischen Information für die shRNA, in das Genom einer eukaryontischen Zelle. Durch die

zusätzliche Integration eines Puromycinresistenzgens konnte sichergestellt werden, dass nach Behandlung mit Puromycin nur die Zellen überleben, die erfolgreich transduziert wurden. Für die Transduktion wurden jeweils 6-8 ml Viruslösung in 10 cm Zellkulturplatten vorgelegt. Pro Ansatz wurden nun 1×10^5 Zellen zugegeben und für ca. 60 min bei 37 °C bei 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden jeweils 5 ml frisches Medium hinzugefügt. Die Infektionsansätze wurden nun bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre 96 h inkubiert. Nach der ersten Passagierung der Zellen wurden 2 µg/ml Puromycin zugesetzt. Die nicht erfolgreich transduzierten Zellen wurden durch Puromycin selektiert. Folglich entstanden Zelllinien mit einer stabilen shRNA Expression des integrierten Gens. Die Effizienz des Knockdowns wurde nachfolgend mit Western Blot nachgewiesen.

2.2.3.3 Transfektion der Zelllinien

Die Transfektion mittels TurboFect™ ist ein effektives Verfahren, um DNA in eukaryontische Zellen einzubringen, und somit vorübergehend eine Expression des gewünschten Gens zu erreichen. TurboFect™ ist ein kationisches Polymer. Es bildet stabile, positiv geladene Komplexe mit der ursprünglich negativ geladenen DNA. Infolge dessen kann die DNA leichter durch die Zellmembran dringen. Zusätzlich wird die DNA vor Abbau geschützt. Es erfolgt jedoch keine Integration der DNA in das Genom der Zelle und die Plasmidexpression endet nach der Zellteilung. Zur Vorbereitung der Transfektion wurden 1×10^6 Zellen am Vortag auf 10 cm Zellkulturplatten ausgesät. Pro Ansatz wurden 600 µl FBS-freies Medium, 6 µl TurboFect™ und 3 µg Plasmid (pcDNA 3.1 Leerkontrolle oder pcDNA3.1 E2F1) in einem Mikroreaktionsgefäß pipettiert, durchmischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde den Zellen tropfenweise der Transfektionsansatz hinzugefügt. Nach 24 stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre wurden die Zellen geerntet. Die Effizienz der Überexpression wurde nachfolgend mit Western Blot nachgewiesen.

2.2.4 Funktionsuntersuchungen

2.2.4.1 Invasivitätsmessung mittels Boyden-Chamber-Assay

Das Boyden-Chamber-Assay ist eine Methode zur Messung der Fähigkeit von Zellen zu Invasivität und Migration. Dabei wird die Fähigkeit zur Migration durch Matrigel®, mithilfe eines chemotaktischen Gradienten gemessen. Der Aufbau des Assays beinhaltet eine 6-Well-Zellkulturplatte mit passenden Einsätzen, die eine perforierte Membran mit 8 µm Porengröße enthalten. Auf diese Einsätze wurde Matrigel® mit einer Konzentration von 3 mg/ml gegeben und 1 Stunde bis zur Aushärtung bei 37 °C inkubiert. Das Matrigel® repräsentierte dabei die Barriere zwischen den Zellkulturmedien, in denen sich ein Konzentrationsgradient an FBS (für RPMI) oder SupplementMix (für KGM) ausbildete. Unter die perforierte Membran und dem Matrigel® wurde 30% FBS-haltiges RPMI Medium oder KGM mit 30% SupplementMix gegeben. Auf die perforierte Membran und das Matrigel® wurden 3×10^5 Zellen in 3% FBS-haltigem RPMI oder 3% SupplementMix-haltigem KGM gegeben. Durch den so entstandenen chemotaktischen Gradienten an FBS oder SupplementMix bestand ein chemotaktischer Reiz für die Zellen das Matrigel® zu verdauen und in das 30% Medium zu migrieren. In folgender Abbildung ist der Aufbau schematisch dargestellt (siehe Abb. 4).

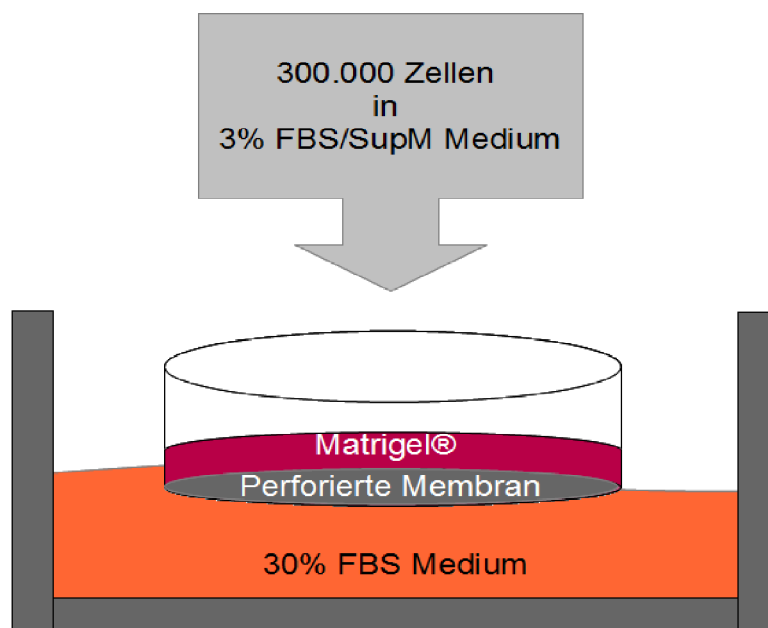


Abb. 4: Schematische Darstellung einer Matrigel®-Invasionskammer

48 h nach Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre wurde das Matrigel® vorsichtig mit einem Wattetupfer von dem Einsatz abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in der Membran in einer PBS-Lösung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Die DAPI Verdünnung betrug 1:2000. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung von DNA eingesetzt wird. Die Zellen, die erfolgreich durch das Matrigel® und die perforierte Membran migrierten, wurden gefärbt. Nach ca. 5 min konnten diese Zellen unter dem Mikroskop bei UV-Licht gezählt werden. Es wurden Bilder der migrierten Zellen angefertigt und ausgewertet.

2.2.4.2 Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrieanalyse

Zur Detektion des relativen Anteils der Zellen, die sich unter Behandlung mit Zytostatika in Apoptose befanden, wurde eine Propidiumiodidfluoreszenz(PI)-Färbung der DNA mit anschließender Durchflusszytometrieanalyse (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) durchgeführt. Dabei bindet das Propidiumiodid stöchiometrisch an doppelsträngige DNA, sodass es im FACS möglich ist, die Zellen einem entsprechenden Zellzyklus zuzuordnen (G0/1=diploid, G2=tetraploid, S=Fluoreszenzsignal liegt zwischen G1 und G2). Durch die Zytostatikabehandlung wird Apoptose induziert und infolgedessen die DNA fragmentiert. Diese DNA Fragmente sind bei der PI-Färbung proportional zum Fluoreszenzsignal in der Sub-G1 Phase. Es wurden 3×10^5 Zellen in 5 ml Medium auf 6 cm Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden im Triplikat ausgesät um eventuelle Messungenauigkeiten auszugleichen. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit Cisplatin, Paclitaxel oder 5-Fluoruracil behandelt. 48 Stunden nach der Behandlung wurde das Medium abgesogen. Nach vorausgegangenem Waschen mit PBS erfolgte die Ablösung der Zellen mit Trypsin. Die Zellen, das Medium und PBS wurden dabei in einem Falcon gesammelt. Nach Zentrifugation bei 1400 rpm (4 °C) für 8 min wurde das Zellpellet in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, mit PBS gewaschen und bei 3600 rpm (4 °C) für 8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml eiskaltem 70% Ethanol resuspendiert und für mindestens 24h bei -20 °C gekühlt. Danach wurde das Mikroreaktionsgefäß bei 4600 rpm (4 °C) für 8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und abermals zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun mit einer Propidiumiodid-Färbelösung, bestehend aus 445 µl PBS, 50 µl Propidiumiodid und 5

µl RNase resuspendiert und 10 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in ein Flow Cytometry Röhrchen übertragen und in das FACS Calibur Durchflusszytometriergerät eingelesen. Die Datenerfassung erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software (BD). Es wurden jeweils 10.000 Zellen gemessen, wobei Forward Scatter, Side Scatter sowie Fluoreszenzdaten logarithmisch erfasst wurden. Die folgende Darstellung zeigt beispielhaft die Quantifizierung apoptotischer Zellen (siehe Abb. 5).

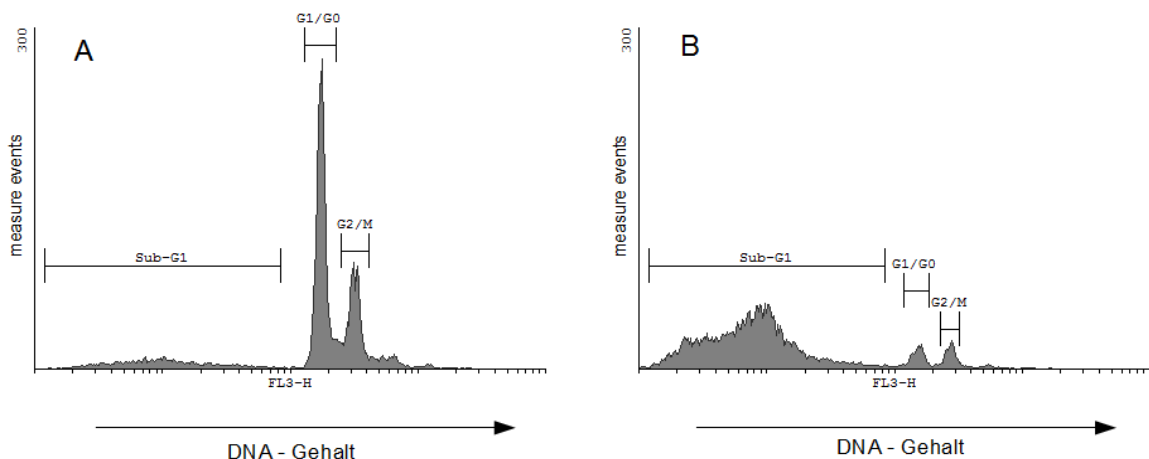


Abb. 5: Beispielhafte Darstellung von Histogrammen. Die Fluoreszenz des Propidiumiodids ist logarithmisch gegen die Zellzahl (measure events) aufgetragen. A) Unbehandelte PeCa Zellen. B) Für 48 h mit 5 µM Paclitaxel behandelte PeCa Zellen. Die DNA der behandelten Zellen ist fast vollständig fragmentiert (86,74 %).

2.2.4.3 Zellvitalitätsbestimmung mittels XTT-Assay

Mithilfe des TACS® XTT cell-proliferation-assay (Trevigen Assay Cell System) von Trevigen® (USA) wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase gemessen. Die Aktivität dieses Enzyms ist in vitalen Zellen deutlich höher als in avitalen Zellen. Das XTT-tetrazolium (2,3-Bis-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz) wird durch mitochondriale Dehydrogenase zu XTT-Formazan reduziert. Dies ist wasserlöslich und orange. Durch eine typische Lichtabsorption bei 490 nm kann gegen einen Referenzwert von 650 nm die relative Anzahl stoffwechselaktiver Zellen bestimmt werden. Dabei werden die vorbereiteten Zellen in einer 48-Well Zellkulturschale ausgesät und mit 100 µl einer XTT Arbeitslösung (98µl XTT-Reagenz und 2µl XTT-Aktivator) behandelt. Nach 2 stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre wurden Proben entnommen und auf eine 96-Well Mikrotiterplatte übertragen. Anschließend wurde die Lichtabsorption mithilfe des Microplate Reader Benchmark von Bio-RAD gemessen. Diese Methode wurde zur

Bestimmung der Zytostatikaresistenz, sowie der Proliferation der Zelllinien genutzt. Bei der Messung der Zytostatikaresistenz wurden 1×10^5 Zellen inkubiert und nach 24 Stunden mit Cisplatin oder Paclitaxel behandelt. Die XTT Messung erfolgte nach weiteren 24 Stunden. Bei der Proliferationsmessung wurden 3 mal 5×10^3 Zellen inkubiert. Das XTT Assay erfolgte nach 24 und 48 Stunden.

2.2.5 Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Softwarepaket von Apache OpenOffice™, Version 3.4.1 durchgeführt.

2.2.5.1 Mittelwert, Varianz und Standardabweichung

Der Mittelwert bildet sich aus dem Quotienten der Summe der Ergebnisse und deren Anzahl. Die Standardabweichung ist ein mathematisches Verfahren um eine wahrscheinliche Steuung eines Wertes in Bezug auf dessen Mittelwert zu errechnen. Als Zwischenprodukt zur Berechnung der Standardabweichung wird die Varianz berechnet. Die Varianz bezeichnet die mittlere, quadratische Abweichung einer Zufallsvariablen von ihrem Mittelwert. Bei der Berechnung der Varianz wird der Quotient aus den Summen der quadrierten Differenzen, aus Messergebnissen und Mittelwerten, und der Anzahl der Messergebnisse gebildet. Die Standardabweichung wird durch die Quadratwurzel der Varianz bestimmt. Die Standardabweichung wird anhand folgender Formel berechnet.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{Messergebniss} - \text{Mittelwert})^2}{\text{Anzahl der Messergebnisse (n)}}}$$

2.2.5.2 Signifikanztestung durch den T-Test bei unabhängigen Stichproben

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse wurde mehrmals eine Signifikanz anhand des T-Tests berechnet. Der T-Test ist ein parametrisches Verfahren bei dem die Differenz des Mittelwertes von 2 Stichprobengruppen verglichen wird. In Verbindung mit der Streuung der Ergebnisse kann eine Aussage über eine statistische Signifikanz getroffen werden. Die Streuung der Ergebnisse wird durch den Standardfehler der Differenz der Mittelwerte berechnet. Der Standardfehler ist die Standardabweichung der Mittelwerte innerhalb der Grundgesamtheit. Als Ergebniss des T-Test wird eine Wahrscheinlichkeit (p) errechnet mit der ein Fehler erster Ordnung vorliegt. Eine Signifikanz wurde bei einer Wahrscheinlichkeit eines Fehlers erster Ordnung von unter 5 % (entspricht $p \leq 0,05$) angenommen. Der T-Test wird anhand folgender Formel durchgeführt.

$$p = \frac{\text{Mittelwert von Stichprobe 1} - \text{Mittelwert von Stichprobe 2}}{\text{Standardfehler der Differenz der Mittelwerte}}$$

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Zelllinien auf Proteinebene

Um einen grundlegenden Überblick über die Regulation und die eventuellen Zielgene von E2F1 in den untersuchten Zelllinien zu gewinnen, wurden Western Blots durchgeführt. Dabei konnten auf Proteinebene Elemente des RB/E2F Signalweges, der p53 Status und diverse EMT-Marker nachgewiesen werden.

3.1.1 Bestimmung des RB/E2F1 Signalweges

Da aus immunhistochemischen Voruntersuchungen bekannt war, dass der Verlust des p16 Gens zu einem aggressiveren Verhalten des Plattenepithelkarzinoms des Penis (*penile squamous cell carcinoma*, PSCC) führt [80], wurde zunächst der RB/E2F1 Signalweg mittels Western Blot untersucht. Dazu wurden die beiden Primärtumorzelllinien (PeCa und PeCa-D) mit den Lymphknotenmetastasenzelllinien (KiLk-D und KiLk-K) und der gesunden Vorhaut-Fibroblastenzelllinie VH-6 verglichen. Die Zelllinie PeCa-D und KiLk-D stammten von einem Patienten. Die detektierten Proteinbanden sind in folgender Abbildung dargestellt (siehe Abb. 6).

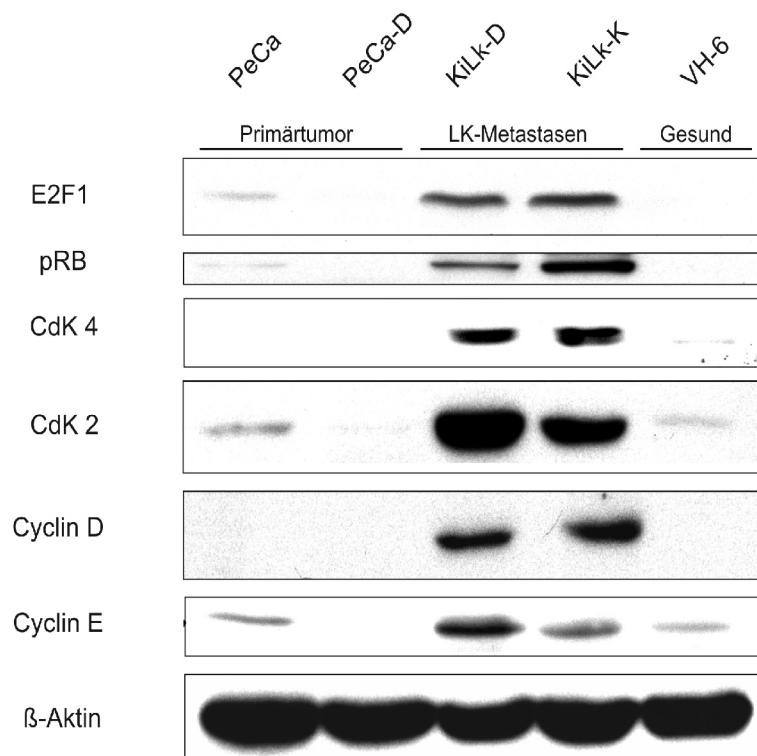


Abb. 6: Darstellung der Expression von E2F1, des inaktiven pRBs und der Cyclin/CdK Kaskade in den Peniskarzinomzelllinien verglichen mit gesundem Vorhautgewebe.

β- Aktin diente als Ladekontrolle.

In den Lymphknotenmetastasen zeigte sich eine deutliche Expression des aktivierenden E2F1 im Vergleich zu den Primärtumoren und dem gesunden Vorhautgewebe. Diese hohe E2F1-Expression korrelierte mit der Expression des inaktiven, phosphorylierten RBs (pRB). Außerdem zeigte sich eine starke Expression der Cyclin-dependet-Kinase 4 (CdK4), deren Liganden Cyclin D, sowie der Cyclin-dependent-Kinase 2 (CdK2) und dessen Liganden Cyclin E in den Metastasenzelllinien. Diese starke Aktivierung der CdKs mitsamt der Cycline korrelierte eindeutig mit der Expression des inaktiven, phosphorylierten RBs und des aktivierenden E2F1.

3.1.2 Bestimmung des p53-Status

Da der negative Einfluss einer hohen p53-Expression bei Patienten mit PSCC bekannt ist [118], war die Prüfung des p53-Status der Tumorzelllinien obligat. Dabei wurde die p53 Proteinexpression der Primärtumorzellen mit den Metastasenzelllinien verglichen. Der anti-p53 Antikörper Pab 1620 weist spezifisch nur den Wildtyp von p53 nach. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung dargestellt (siehe Abb. 7).

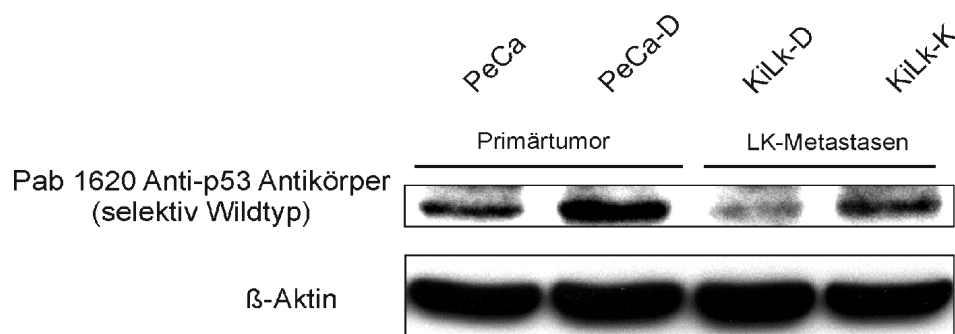


Abb. 7: Darstellung der p53-Expression mit Western Blot. Der p53-Status der Primärtumorzellen wurde mit den Lymphknotenmetastasenzellen verglichen. Wildtyp p53 wurde durch den anti-p53 Antikörper Pab 1620 nachgewiesen. Der Pab 1620 anti-p53 Antikörper weist selektiv Wildtyp p53 nach. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Es zeigte sich eine starke p53-Expression in den Primärtumorzellen verglichen mit den Lymphknotenmetastasenzelllinien. Besonders in der Zelllinie KiLk-D zeigte sich eine verminderte Expression von p53.

3.1.3 Bestimmung bekannter Marker der Epithelial-Mesenchymalen Transition in Peniskarzinomzelllinien

Um die Zelllinien weitergehend zu charakterisieren, wurden Western Blot Analysen zur Detektion bekannter EMT-Marker und EMT regulierender Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Dadurch sollte ein Überblick über aggressivitätsrelevante Proteine gewonnen werden, um eine mögliche Korrelation mit E2F1 aufzudecken. Dazu wurden die Primärtumorzelllinien (PeCa und PeCa-D) mit den Lymphknotenmetastasenzelllinien (KiLk-D und KiLk-K) verglichen. Die detektierten Proteinbanden sind in folgender Abbildung dargestellt (siehe Abb. 8).

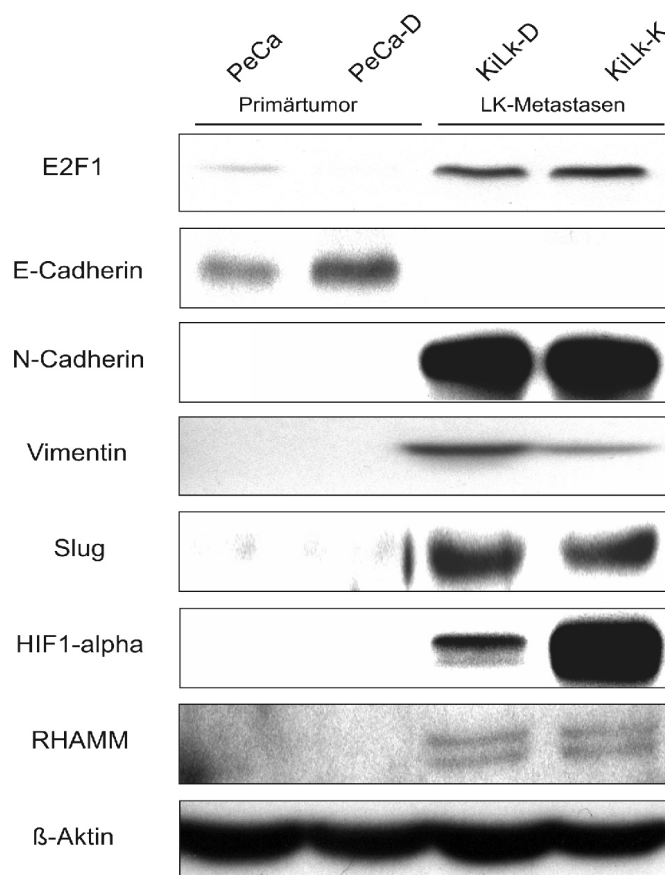


Abb. 8: Darstellung der Proteinexpression bekannter EMT-Marker im Verhältnis zu E2F1. Die Primärtumorzellen wurden mit den Lymphknotenmetastasenzellen verglichen. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Im Einzelnen wurden die Zelllinien auf die Expression bekannter Marker der EMT untersucht. Dabei zeigten sich starke Proteinbanden bei N-Cadherin und Vimentin in den Lymphknotenmetastasenzellen. In den Primärtumorzellen konnte keines dieser Proteine nachgewiesen werden. Dafür zeigte sich nur in den Primärtumoren das für epitheliale Differenzierung typische E-Cadherin. Weitergehend wurde die Proteinexpression von Slug, HIF1- α und RHAMM untersucht. In den Lymphknotenmetastasenzellen zeigte sich eine

deutliche Expression von Slug, HIF1- α und RHAMM. In den Primärtumorzellen waren sie nicht nachweisbar. Diese Proteine sind keine klassischen EMT-Marker. Sie haben jedoch häufig regulatorischen Einfluss auf die EMT. Die Expression von N-Cadherin, Vimentin, Slug, RHAMM und HIF1- α korreliert dabei signifikant mit der Expression von E2F1.

3.2 Regulation der EMT-Marker durch E2F1

Da die vorausgegangene Charakterisierung der Zelllinien auf Proteinebene eine deutliche Deregulation des RB/E2F Signalweges, sowie eine Hochregulation von EMT-Markern in den Lymphknotenmetastasen gezeigt hatte, war eine Beteiligung von E2F1 an der malignen Progression und der EMT durchaus denkbar. Deshalb wurde in nachfolgenden Experimenten der Einfluss von E2F1 auf die EMT-Marker, sowie auf das Verhalten der Zelllinien in Funktionsuntersuchungen überprüft.

3.2.1 Überprüfung der Infizierbarkeit der Lymphknotenmetastasenzellen

Die Western Blot Analysen hatten eine hohe Proteinexpression des E2F1/RB Signalweges und von EMT assoziierten Proteinen in den Lymphknotenmetastasenzellen detektiert. Eine weitergehende Untersuchung dieser Proteinexpression in diesen Zelllinien war deshalb sinnvoll. Dafür sollte die Infizierbarkeit der Lymphknotenmetastasenzellen getestet werden, um später einen genetischen E2F1 Knockdown in diesen Zelllinien durchzuführen. Ein E2F1-Knockdown der Primärtumorzellen war nicht sinnvoll, da in diesen Zelllinien keine hohen E2F1-Expressionen nachweisbar waren. Die Transduktion der Lymphknotenmetastasenzellen mit einem adenoviralem Vektorsystem hat den Vorteil einer kurzfristigen starken Herunterregulation eines Gens. Durch den adenoviralen Vektor werden zudem alle Tumorzellen transduziert.

Die Lymphknotenmetastasenzellen wurden durch einen adenoviralen Vektor mit einem GFP exprimierenden Gen transduziert (siehe 2.2.3.1). Das GFP Gen stammt aus der Tiefseealge *Aequorea victoria* und exprimiert ein Protein, welches unter UV-Licht grün fluoresziert. Es wurden 1×10^6 Zellen auf einer 10 cm Zellkulturplatte in 10 ml Medium ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesogen und die benötigte Vektormenge zugegeben. Nach ca. 30 minütiger Inkubation wurde die Zellkulturplatte mit 10 ml Medium aufgefüllt. 48 h nach der Transduktion konnten als

Nachweis für die Infizierbarkeit der Zellen, unter UV-Licht grün fluoreszierende GFP-positive Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 9).

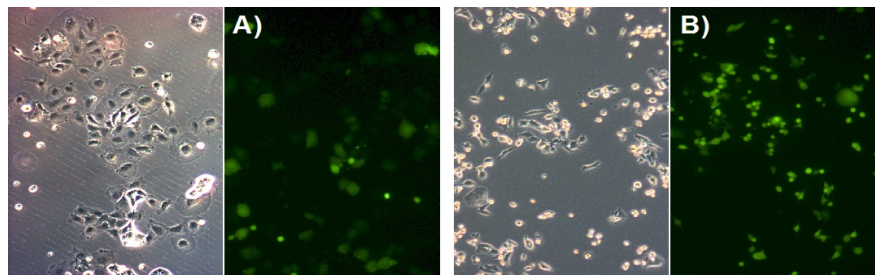


Abb. 9: Lymphknotenmetastasenzellen 48 h nach Transduktion mit GFP exprimierendem Plasmid (Ad.GFP) durch adenoviralen Vektor. Links jeweils lichtmikroskopisches Bild, rechts jeweils unter UV-Licht. A) KiLk-D. B) KiLk-K.

3.2.2 Überprüfung der Regulierbarkeit der EMT-Marker durch E2F1

Um die Frage zu klären, ob E2F1 einen Einfluss auf die Proteinexpression der EMT-Marker hat, wurden Western Blots mit transientem E2F1-Knockdown bei den aus Lymphknotenmetastasen etablierten Zelllinien (siehe 2.2.3.1) und E2F1-Überexpression bei den aus Primärtumoren etablierten Zelllinien (siehe 2.2.3.3) durchgeführt. Grundlage für den E2F1-Knockdown ist das Phänomen der RNA-Interferenz (siehe 2.2.3). Die RNA-Interferenz ist ein Phänomen, bei dem eine posttranskriptionelle Ausschaltung eines Gens durch die Anlagerung des Gegenstranges der shRNA an die komplementäre Zielsequenz der mRNA stattfindet. Die viralen Vektoren zum gezielten E2F1-Knockdown waren in dem Institut für experimentelle Gentherapie und Tumorforschung bereits vorhanden. Der Knockdown von E2F1 durch virale Transduktionen von shRNA wurde bereits in anderen Experimenten aus dem Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung erfolgreich eingesetzt [32], [97], [98]. Als Positivkontrolle wurde auch Cyclin E bestimmt, das ein direktes Zielgen von E2F1 darstellt [119].

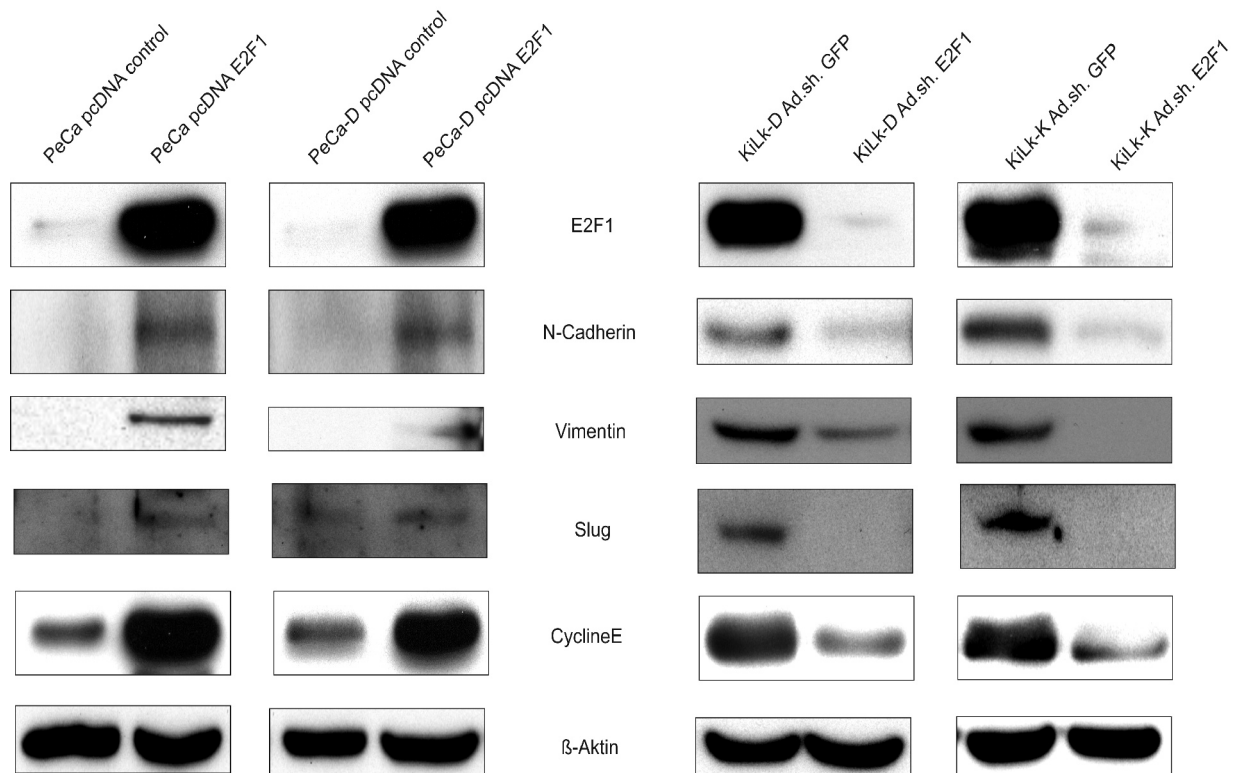


Abb. 10: Western Blots mehrerer durch E2F1 regulierter Proteine. Links: E2F1-Überexpression in den Primärtumorzelllinien; rechts: E2F1-Knockdown in den Lymphknotenmetastasenzelllinien. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Wie in Abb. 10 dargestellt, werden sowohl Cyclin E, als auch Slug und die EMT-Marker, durch E2F1 reguliert. In den Primärtumorzellen mit ektopter E2F1-Expression steigt die Cyclin E Expression an, während die hohe endogene Cyclin E Expression in Metastasenzellen nach E2F1 Depletion abnimmt. Slug und die EMT-Marker N-Cadherin und Vimentin zeigten ebenfalls eine Regulierbarkeit durch E2F1. Die Proteinexpression von N-Cadherin, Vimentin und Slug erhöhte sich in den E2F1-überexprimierten Primärtumorzellen und verringerte sich in den E2F1-Knockdown-Lymphknotenmetastasenzellen. Bei den transduzierten und transfizierten Zellen konnten die Proteine E-Cadherin, HIF1- α und RHAMM nicht durch Western Blot nachgewiesen werden.

3.3 Untersuchung der Tumorzelllinien in Funktionsassays

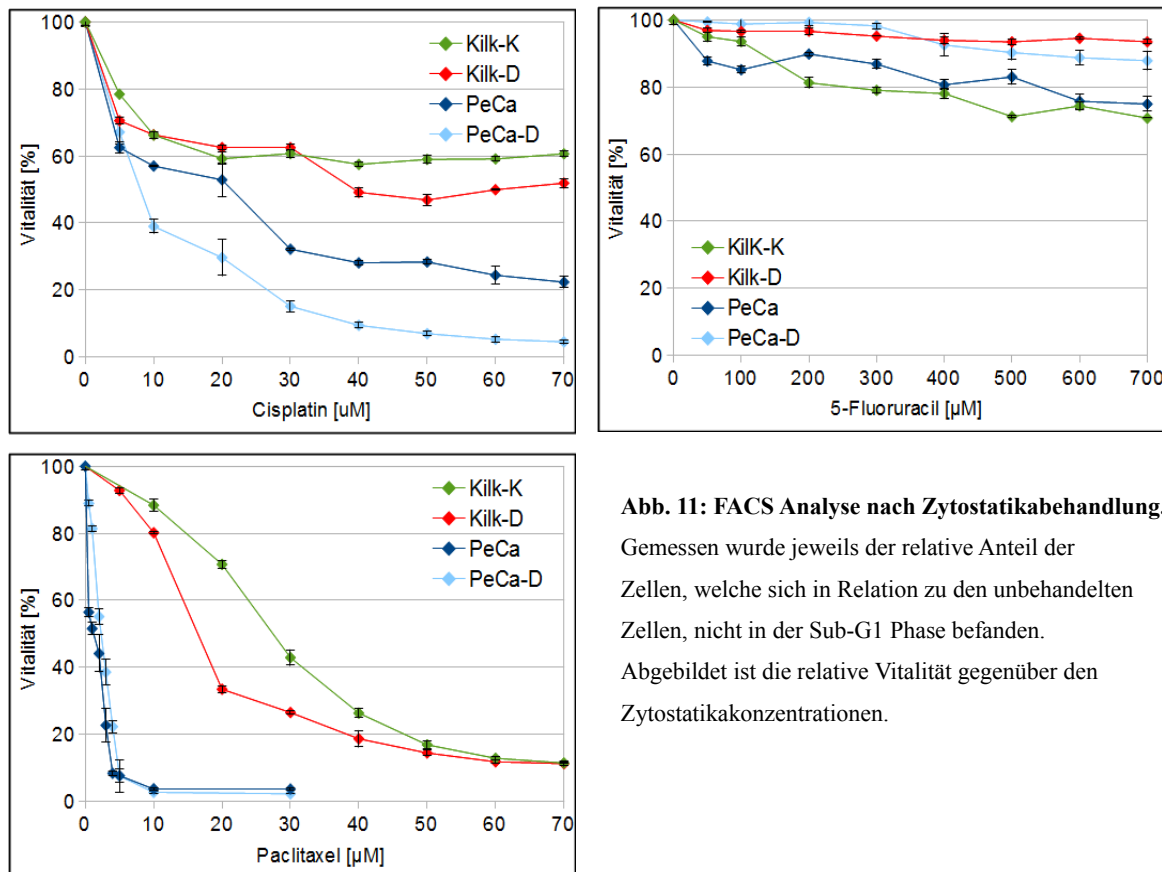
Nachdem eine Charakterisierung der Zelllinien in Hinblick auf die Expression aggressivitätsrelevanter Proteine und deren Regulierbarkeit durch E2F1 erfolgt war, wurden deren funktionelle Eigenschaften in zytologischen *in-vitro* Funktionsuntersuchungen bestimmt. Dazu wurde die Zytostatikaresistenz mittels XTT-Assay und Propidiumiodidfärbung in der Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Außerdem erfolgte die Messung der Invasivität im Boyden-Chamber-Assay und die Messung der Proliferation im XTT-Assay.

3.3.1 Charakterisierung der Zytostatikaresistenz

Um die Resistenz der Zelllinien gegen *in-vitro* Zytostatikabehandlung zu untersuchen, wurden die Zellen mit Cisplatin, Paclitaxel und 5-Fluoruracil behandelt. Die Auswahl der Zytostatika orientierte sich dabei an dem in der Urologischen Klinik und Poliklinik Rostock etablierten, leicht abgewandelten Zytostatikaschema von Pizocarro et al. [120]. Die klinische Dosis von Cisplatin und Paclitaxel ist miteinander vergleichbar, so dass auch in diesem Modellsystem mit den gleichen Dosierungen gearbeitet wurde. Die Dosis von 5-Fluoruracil wurde gegenüber der klinischen Anwendung verzehnfacht.

3.3.1.1 Zytostatikaresistenzmessung mittels FACS

Um ein Modellsystem zur Untersuchung der Zytostatikaresistenz im metastasierten Peniskarzinom zu etablieren, wurde die Vitalität der Zelllinien unter Zytostatikabehandlung in der Durchflusszytometrieanalyse (FACS) mit Propidiumiodidfärbung gemessen. Als interessanter Nebeneffekt konnte außerdem die Potenz der verschiedenen Zytostatika beurteilt werden. Dies ist aufgrund der aktuell unbefriedigenden Situation in der Zytostatikabehandlung des Peniskarzinoms von hohem klinischen Interesse. Die Vitalität der vier Peniskarzinomzelllinien wurde bei jeweils acht verschiedenen Zytostatikakonzentrationen gemessen. Die Ergebnisse werden in folgender Abbildung dargestellt (siehe Abb. 11).



Bei der Primärtumorzelllinien PeCa-D lag der Anteil vitaler Zellen bereits bei 2 µM Paclitaxel nur noch bei 44,15 %. Der maximale Vitalitätsverlust stellte sich schon ab 10 µM Paclitaxel mit nur noch 2,76 % ein. Ähnlich reagierte die Primärtumorzelllinie PeCa mit einem Vitalitätsverlust auf 55,17 % bei 2 µM Paclitaxel und einem maximalen Vitalitätsverlust ab 10 µM Paclitaxel auf 3,8%. Die Metastasenzelllinien erwiesen sich hingegen als äußerst resistent. KiLk-D befand sich erst ab einer Konzentration von 10 µM Paclitaxel bei 80,16 % und bei 20 µM bei 33,5% Vitalität. Der maximale Vitalitätsverlust stellte sich erst bei 60 µM Paclitaxel auf 11,87 % ein. KiLk-K reagierte sogar erst bei 30 µM Paclitaxel mit einem Vitalitätsverlust auf 42,95 %. Der maximale Vitalitätsverlust dieser Zelllinie stellte sich ebenfalls erst ab 60 µM auf 12,91 % ein. Die Reaktion auf Cisplatin war prinzipiell gleich, aber deutlich gemäßiger. Die Primärtumorzellen reagierten wie bei Paclitaxel mit einem stärkeren Vitalitätsverlust als die Metastasenzellen. Die dafür benötigte Dosis lag jedoch deutlich höher als die von Paclitaxel und teilweise konnte kein annähernd hundertprozentiger Vitalitätsverlust nachgewiesen werden. Im Einzelnen war in der Primärtumorzelllinie PeCa-D eine Dosis von 10 µM Cisplatin

notwendig, um eine Senkung der Vitalität auf 39,02 % zu erreichen. Der maximale Vitalitätsverlust lag bei 40 μ M Cisplatin auf 9,5 %. Bei der Primärtumorzelllinie PeCa war eine Konzentration von 20 μ M Cisplatin notwendig, um die Vitalität auf 52,9 % zu verringern. Der maximale Vitalitätsverlust lag ebenfalls ab 40 μ M Cisplatin bei 28,13 % vitaler Zellen. Die Metastasenzelllinien hingegen zeigten abermals ein geringeres Ansprechen auf die zytostatische Behandlung. KiLk-D konnte erst mit 40 μ M Cisplatin auf 49,19 % Vitalität reduziert werden. Dieser Wert war zugleich der maximale Vitalitätsverlust. KiLk-K konnte ebenfalls bei 40 μ M nur auf eine Vitalität von 57,15 % gebracht werden. Ebenfalls erwies sich dieser Wert als maximaler Vitalitätsverlust. Das Ansprechen der Tumorzelllinien auf 5-Fluoruracil war durchweg schlecht. Der Vitalitätsverlust war nahezu dauerhaft konstant und nicht annähernd vollständig. Die annähernd konstante Vitalität der Primärtumorzelllinie PeCa-D lag bei 500 μ M 5-Fluoruracil bei 90,29 %. Die Primärtumorzelllinie PeCa lag ebenfalls bei 500 μ M 5-Fluoruracil bei 83,01 % Vitalität. Die Lymphknotenmetastasenzelllinie KiLk-D lag bei 500 μ M 5-Fluoruracil nur bei 93,45 % Vitalität. Die Lymphknotenmetastasenzelllinie KiLk-K zeigte überraschend bei 500 μ M 5-Fluoruracil noch 71,2% Vitalität. Aufgrund des generell sehr schlechten Ansprechens der Tumorzelllinien auf 5-Fluoruracil wurden keine weiteren Experimente mit diesem Zytostatikum durchgeführt.

Zusammenfassend war eine klare Überlegenheit von Paclitaxel gegenüber Cisplatin und 5-Fluoruracil zu sehen, sowie ein deutlich besseres Ansprechen der Primärtumorzelllinien gegenüber den Metastasenzelllinien auf Paclitaxel und Cisplatin. Vergleicht man alle Tumorzelllinien bei 30 μ M Cisplatin und Paclitaxel miteinander (siehe Abb.11) zeigt sich eine deutliche Signifikanz bei der Minderung der Zellvitalität durch Paclitaxel gegenüber Cisplatin ($p < 0,05$) und bei der Zytostatikaresistenz der Metastasenzelllinien verglichen mit den Primärtumorzelllinien ($p \leq 0,05$).

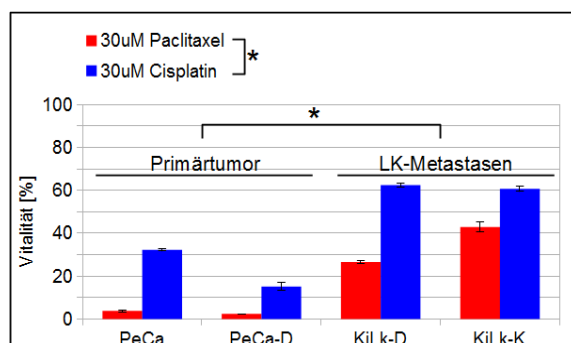


Abb.12: Vergleich der Tumorzelllinien bei 30 μ M Cisplatin und Paclitaxel, im Verhältnis zur Vitalität. * signifikant nach T-Test ($p \leq 0,05$).

3.3.1.2 Zytostatikaresistenzmessung mittels XTT-Assay

Um die bereits aus den FACS-Messungen gewonnenen Daten zu bestätigen, wurde die Zytostatikaresistenz der Tumorzelllinien erneut mit dem XTT-Assay untersucht. Bei dem XTT-Assay wurde die Vitalität der vier Tumorzelllinien durch die Fähigkeit zur Verstoffwechslung des XTT-Tetrazoliums in XTT-Formazan durch ausschließlich vitale Zellen gemessen. Ähnlich der FACS-Messung wurde die Vitalität bei sieben Zytostatikakonzentrationen bestimmt (Abb. 13).

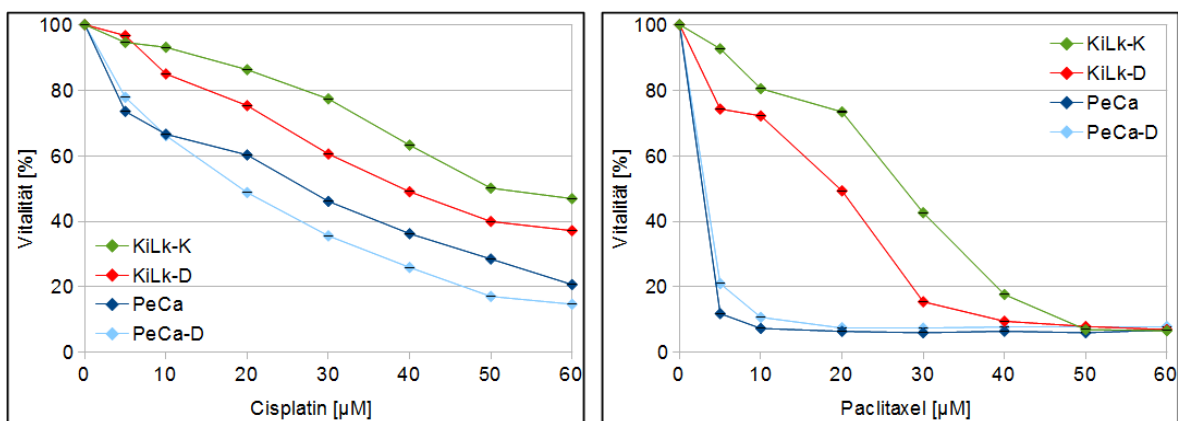


Abb. 13: Darstellung der Zytostatikaresistenzmessung mittels XTT-Assay. Die Vitalität der Zelllinien wurde in Relation zu den jeweiligen unbehandelten Zellen und gegen die verschiedenen Zytostatikakonzentrationen aufgetragen.

Die Vitalität der Primärtumorzelllinie PeCa-D sank bereits bei 5 µM Paclitaxel auf 20,9 % ab (Abb. 13). Ein maximaler Vitalitätsverlust wurde schon ab 10 µM Paclitaxel auf 10,73 % Vitalität beobachtet. Die zweite Primärtumorzelllinie PeCa verhielt sich mit einer Vitalität von 11,86 % bei 5 µM Paclitaxel und einem maximalen Vitalitätsverlust auf 7,32 % bei 10 µM Paclitaxel ähnlich. Die Lymphknotenmetastasenzelllinie KiLk-D zeigte erst bei 20 µM Paclitaxel eine Vitalität von 49,31 %. Ein maximaler Vitalitätsverlust stellte sich bei 40 µM Paclitaxel auf 9,52 % ein. Die Lymphknotenmetastasenzelllinie KiLk-K zeigte hingegen erst ab 30 µM Paclitaxel eine Vitalität von 42,62 %. Der maximale Vitalitätsverlust stellte sich erst ab 50 µM Paclitaxel auf 6,97 % ein. Unter Cisplatin verhielten sich die Tumorzelllinien ähnlich. Die Primärtumorzelllinie PeCa-D zeigte bei relativ konstantem Abfall bei 30 µM Cisplatin eine Vitalität von 35,56 %. Ein maximaler Vitalitätsverlust stellte sich bei 60 µM auf 14,73 % ein. Die zweite Primärtumorzelllinie PeCa zeigte bei einer Cisplatinkonzentration von 30 µM eine Vitalität von 46,09 %. Eine minimale Vitalität von 20,71 % zeigte sich bei einer Konzentration von 60 µM Cisplatin.

Die Lymphknotenmetastasenzelllinie KiLk-D zeigte bei 30 μM CisplatinKonzentration eine Vitalität von 60,55 % und eine minimale Vitalität von 37,15 % bei 60 μM . Den geringsten Vitalitätsverlust zeigte die Lymphknotenmetastasenzelllinie KiLk-K. Bei 30 μM Cisplatin betrug die Vitalität noch 77,35 % und selbst bei 60 μM zeigte sich eine Restvitalität von 46,92 %.

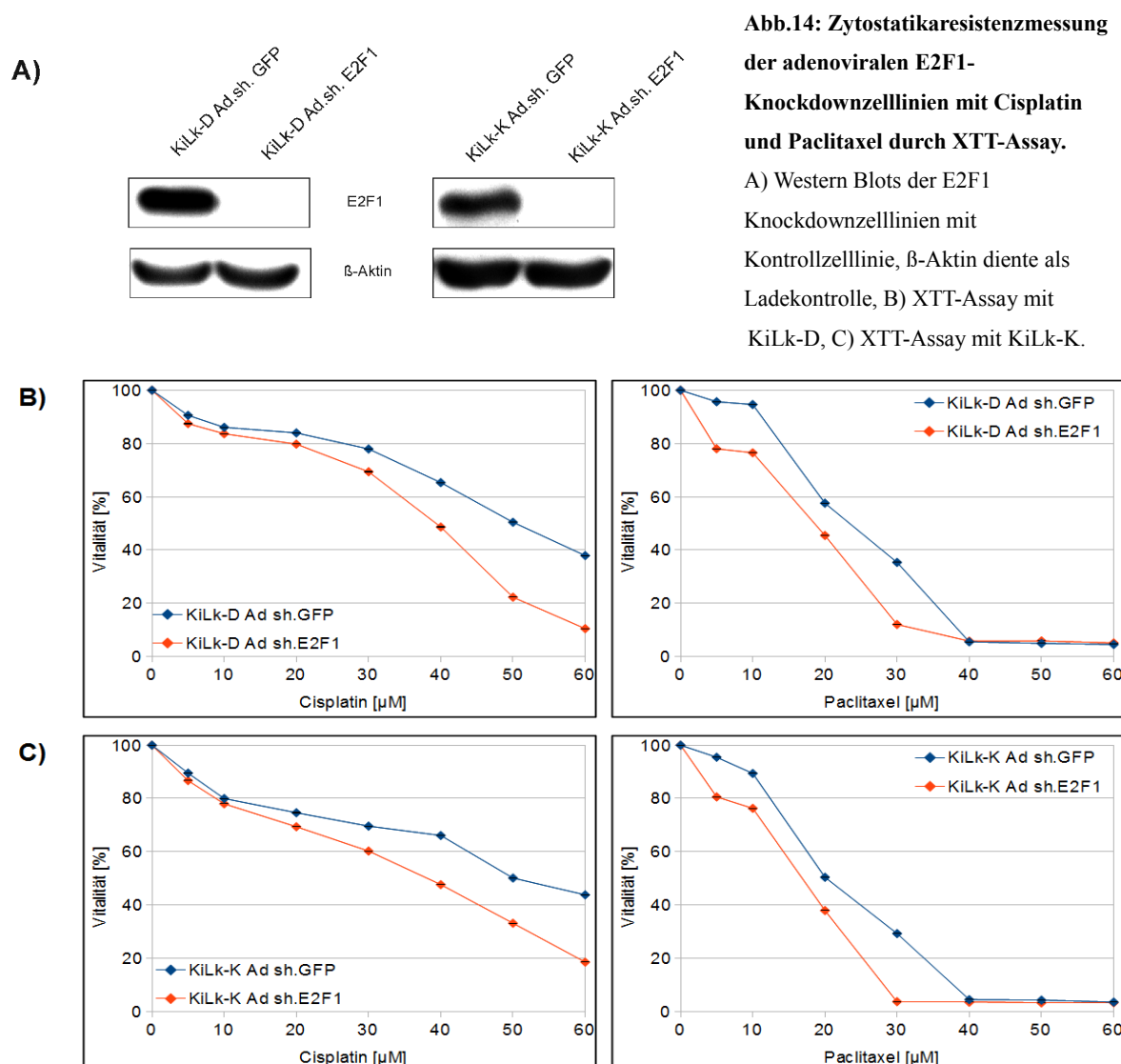
Zusammenfassend konnten die Ergebnisse aus der FACS-Messung im XTT-Assay reproduziert werden. Auch bei dem XTT-Assay reagierten die Lymphknotenmetastasenzelllinien, verglichen mit den Primärtumorzelllinien deutlich resistenter gegenüber der Cisplatin- und Paclitaxeltherapie. Außerdem zeigte sich erneut die überlegene Wirkung von Paclitaxel gegenüber Cisplatin. Ein nahezu komplettes Absterben der Tumorzellen konnte nur bei der Behandlung mit Paclitaxel erreicht werden. Die dafür benötigte Dosis lag bei den Primärtumorzellen bei 10 μM und bei den Metastasenzellen bei 50 μM . Die Behandlung mit 60 μM Cisplatin führte lediglich zu einer Vitalitätsminderung auf ca. 20 % bei den Primärtumorzellen und auf ca. 40 % bei den Metastasenzellen. Dosisvergleiche für die zytostatische in vitro Behandlung von Peniskarzinomzelllinien existieren bis jetzt nicht. Ein vollständiges Absterben der Tumorzellen durch Cisplatin erfolgte bei zytostatikasensitiven Kopf-Hals-Tumorzellen bei ca. 100 μM [121].

3.3.2 Sensibilisierung Zytostatika-resistenter Peniskarzinomzelllinien durch E2F1-Knockdown

Um die Rolle von E2F1 bei der Zytostatikaresistenz näher zu untersuchen, wurden gezielte Knockdown-Experimente durchgeführt. Aus diesem Grund wurde E2F1 in beiden Lymphknotenmetastasenzelllinien depletiert, wobei die shRNAs, sowohl mittels adenoviralem, als auch lentiviralem Vektor in die Zellen eingebracht wurden. Die Experimente wurden mit beiden Vektorsystemen durchgeführt, um methodische Fehler auszuschließen. Außerdem sollte gezeigt werden, dass eine langfristige Integration des Gens zum E2F1 Knockdown in die Zell-DNA durch einen lentiviralen Vektor nicht zu einer Verfälschung des Verhaltens der Tumorzellen führt. Die Ergebnisse dieser Versuche werden nun im folgenden Abschnitt dargestellt.

3.3.2.1 E2F1-Knockdown mittels adenoviralem Vektor

Um einen transienten Knockdown von E2F1 in den Lymphknotenmetastasenzellen durchzuführen, wurde eine gegen das E2F1-Transkript gerichtete shRNA in die Zellen eingebracht. Wie bei den vorherigen Depletionsexperimenten basiert auch hier der Knockdown von E2F1 auf dem Prinzip der RNA-Interferenz (siehe 2.2.3). Als Kontrollgruppe wurden dieselben Tumorzelllinien mit einer gegen GFP gerichteten shRNA transduziert. Der Erfolg der E2F1 Inhibition wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Parallel dazu wurden die transduzierten Zellen auf ihre Zytostatikaresistenz mittels XTT-Assay gemessen. Dafür wurden 1×10^5 Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Zytostatikakonzentrationen behandelt. Anschließend wurde die XTT-Formazankonzentration photometrisch bestimmt und mit dem Wert der jeweiligen unbehandelten Zelllinie verrechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.



Nach Inhibition von E2F1 zeigte sich eine deutliche Sensitivierung gegenüber zytostatischer Behandlung. Dabei reagierten die Knockdownzelllinien samt Kontrollzelllinien von KiLk-D ähnlich wie die von KiLk-K. Die E2F1-Knockdownzelllinie von KiLk-D reagierte unter Cisplatingabe mit einem signifikanten Vitalitätsverlust ab einer Konzentration von 20 μM ($p \leq 0,05$). Diese Unterschiede zwischen der Kontrollzelllinie und der Knockdownzelllinie nahmen bei steigender Cisplatinkonzentration konstant bis zu einem Maximum von ca. 20 % bei 60 μM zu. Wie schon mehrfach gezeigt, reagierten die Zelllinien auf Paclitaxel deutlich sensibler als auf Cisplatin. Bereits von 5 bis 30 μM Paclitaxelkonzentration zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der E2F1-Knockdownzelllinie und der Kontrollzelllinie von KiLk-D ($p \leq 0,05$). Auch KiLk-K reagierte ab 20 μM Cisplatin mit einem signifikanten Unterschied zwischen der E2F1-Knockdownzelllinie und der Kontrollzelllinie ($p \leq 0,05$). Wie bei KiLk-D gipfelte dieser Vitalitätsunterschied bei einer Cisplatinkonzentration von 60 μM bei etwa 20 %. Unter Paclitaxel wurde wiederum ein ähnliches Verhalten wie bei KiLk-D nachgewiesen. Wie bei KiLk-D zeigten sich bereits von 5 bis 30 μM signifikante Unterschiede der Vitalität der Tumorzellen ($p \leq 0,05$). Ab 40 μM war die Paclitaxelkonzentration jedoch tödlich, so dass nahezu alle Zellen im XTT-Assay avital waren. Funktionelle Aussagen waren ab dieser Konzentration nicht mehr möglich.

3.3.2.2 E2F1 Knockdown mittels lentiviralem Vektor

Um die Ergebnisse aus dem vorherigen Experiment zu bestätigen, wurde die Zytostatikasensitivierung mit stabilem E2F1-Knockdown in den Lymphknotenmetastasenzellen KiLk-D und KiLk-K wiederholt. Dazu wurden stabile E2F1-Knockdownzelllinien durch Transduktion mit einem lentiviralen sh.E2F1-Expressionsplasmid hergestellt (siehe 2.2.3.2). Dafür wurden zwei unterschiedliche sh.RNAs transduziert, die sich gegen unterschiedliche Zielsequenzen in der mRNA von E2F1 richteten. Als Negativkontrolle wurde eine sh.RNA ohne genetische Zielstruktur transduziert. Es wurden 1×10^5 Zellen mit 6-8 ml Vektorsuspension für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 5 ml Medium hinzugefügt. Die Transduktionsansätze wurden danach 96 h inkubiert. Nach der ersten Passagierung der Zelllinien wurden 2 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin zugesetzt. Die erfolgreich transduzierten Zellen wurden durch Puromycin selektiert. Der effiziente E2F1-Knockdown durch die verwendeten shRNAs wurde auch

hier im Western Blot überprüft (Abb. 15).

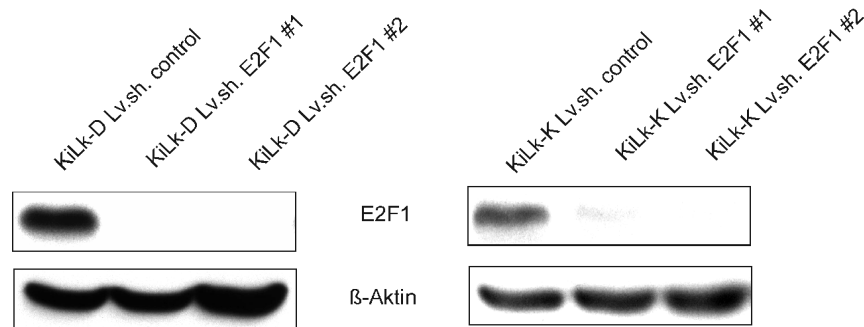


Abb. 15: Western Blots der E2F1-Knockdownzelllinien mit Kontrollzelllinie durch ein lentivirales Vektorsystem. β -Aktin dient der Ladekontrolle.

Die Testung der Zytostatikaresistenz der E2F1 depletierten Zellen wurde durch ein XTT-Assay überprüft. Dafür wurden 1×10^5 Zellen nach 24 h Inkubation mit Cisplatin oder Paclitaxel behandelt. Die Zytostatikadosierungen wurden anhand des vorherigen Versuches festgelegt (siehe. 3.3.2.1.). Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung dargestellt.

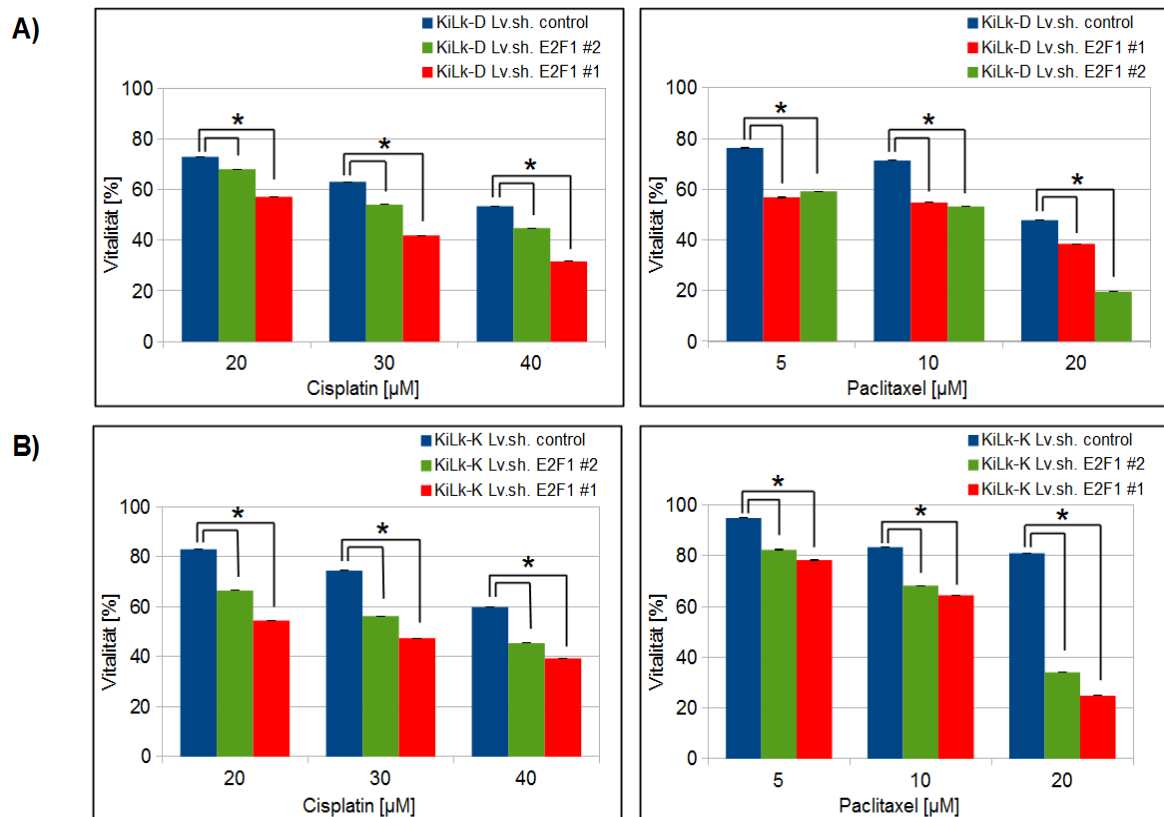


Abb. 16: Zytostatikaresistenzmessung der stabilen E2F1-Knockdownzelllinien mit Cisplatin und Paclitaxel durch XTT-Assay. Die relative Vitalität der E2F1-Knockdownzelllinien und Kontrollzelllinien, aufgetragen gegen die Zytostatikakonzentrationen. A) XTT-Assay mit KiLk-D, B) XTT-Assay mit KiLk-K, * signifikant nach T-Test ($p \leq 0,05$).

Die E2F1 depletierten Zellen reagierten deutlich sensibler auf die Behandlung mit Cisplatin und Paclitaxel. Bei der Auswertung der E2F1-Knockdownzelllinie KiLk-D zeigte sich ein durchschnittlicher Vitalitätsverlust von ca. 10-20% im Verhältnis zur Kontrollgruppe mit den parenteralen Zellen. Wie auch bei der vorausgegangenen Charakterisierung der Zelllinien beobachtet wurde, bewirkte Paclitaxel einen deutlich stärkeren Vitalitätsverlust als Cisplatin. Die Unterschiede zwischen der Vitalität der E2F1-Knockdownzellen und der jeweiligen Kontrollgruppe waren dabei statistisch signifikant ($p \leq 0,05$). Bei der Auswertung der Vitalität der Lymphknotenmetastasenzelllinie KiLk-K ließ sich ebenfalls ein deutlicher Vitalitätsverlust der E2F1-Knockdownzellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe nachweisen. Im Durchschnitt betrug dieser Verlust ca. 20-30 %. Wie auch bei den Versuchen mit KiLk-D bewirkte Paclitaxel bei KiLk-K einen deutlich stärkeren Vitalitätsverlust als Cisplatin. Statistisch gesehen sind auch bei KiLk-K die Unterschiede zwischen den E2F1-Knockdownzelllinien und der Kontrollgruppe signifikant ($p \leq 0,05$).

3.3.3 Charakterisierung der Invasivität mittels Boyden-Chamber-Assay

Um die Eigenschaften der Tumorzelllinien weiter zu charakterisieren, wurde die Boyden-Chamber-Methode zur Untersuchung der Invasivität der Zelllinien durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Fähigkeit einer Zellpopulation, innerhalb von 48 h durch Matrigel® zu migrieren, gemessen (siehe Abb. 17).

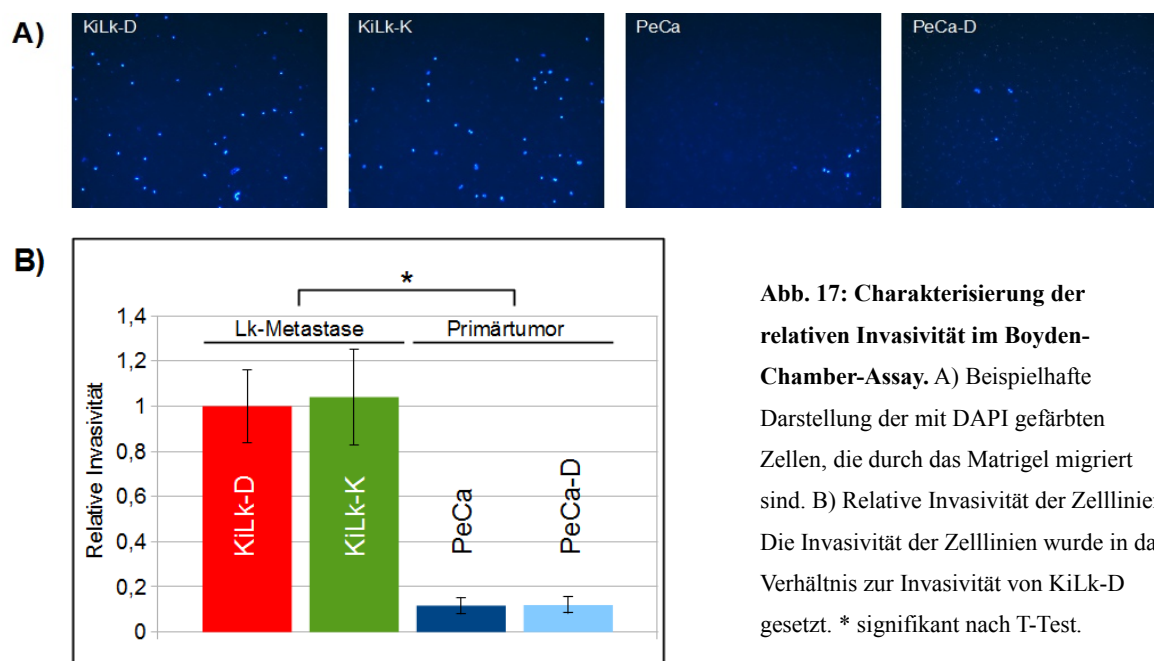


Abb. 17: Charakterisierung der relativen Invasivität im Boyden-Chamber-Assay. A) Beispielhafte Darstellung der mit DAPI gefärbten Zellen, die durch das Matrigel migriert sind. B) Relative Invasivität der Zelllinien. Die Invasivität der Zelllinien wurde in das Verhältnis zur Invasivität von KiLk-D gesetzt. * signifikant nach T-Test.

Bei den Boyden-Chamber-Assays zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Invasivität der Tumorzelllinien. Die Primärtumorzellen (PeCa und PeCa-D) verhielten sich signifikant weniger invasiv ($p \leq 0,05$) als die Lymphknotenmetastasenzellen (KiLk-D und KiLk-K). Die Invasivität der Primärtumorzelllinien PeCa und PeCa-D und der Lymphknotenmetastasenzelllinien KiLk-D und KiLk-K untereinander zeigten keine Unterschiede.

3.3.4 E2F1-Knockdown führt zur Abnahme der Invasivität von Peniskarzinomzellkulturen

Da E2F1 in diesem Modellsystem zur Zytostatikaresistenz und zur verstärkten Expression mesenchymaler Marker beiträgt, lag die Vermutung nahe, dass auch andere aggressivitätssteigernde Eigenschaften der Tumorzellen wie deren migratorisches/invasives Verhalten durch E2F1 moduliert werden. Sollte E2F1 die Invasivität steigern, müsste ein gezielter Knockdown eine Abnahme der Invasivität nach sich ziehen. Aus diesem Grund wurden Invasivitätsmessungen mit stabilem E2F1-Knockdown in beiden Zelllinien aus Lymphknotenmetastasen durchgeführt. Es wurden die stabil gehaltenen E2F1-Knockdownzelllinien aus dem Experiment zur Zytostatikaresistenzmessung sowie die unbehandelten Metastasenzelllinien verwendet (siehe 3.3.2.2.). Wie bei der vorherigen Charakterisierung der Tumorzelllinien, wurde die Anzahl der nach 48 h durch das Matrigel® migrierten Zellen gemessen und ausgewertet (siehe Abb. 18).



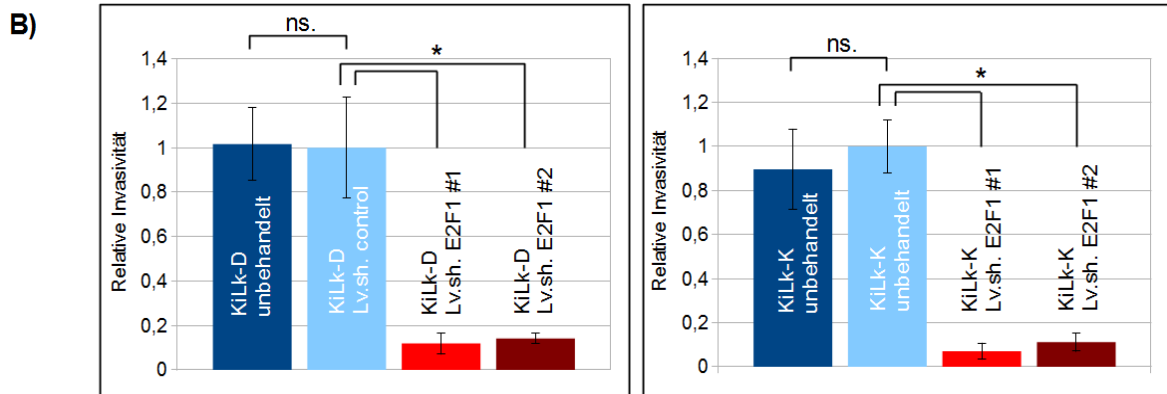


Abb. 18: Invasivitätsmessung der E2F1-Knockdownzelllinien mit Boyden-Chamber. A) Beispielhafte Darstellung der mit DAPI gefärbten, migrierten Zellen, B) Relative Invasivität der Zelllinien. Die Invasivität der Zelllinien wurde in das Verhältnis zur Invasivität der Kontrollzelllinie, LV.sh.control gesetzt. * signifikant nach T-Test ($p \leq 0,05$), ns. nicht signifikant.

Die Ergebnisse im Boyden-Chamber-Experiment zeigten deutliche Unterschiede nach E2F1-Knockdown. Nach Inhibition von E2F1 in KiLk-D Zellen reduzierte sich die Invasivität auf ca. 12 bzw. 14 % der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p \leq 0,05$). Die KiLk-D sh.control-Zellen exprimierten eine sh.RNA die, gegen kein bekanntes Gen gerichtet ist. Die Invasivität der Kontrollzelllinie zeigte keinen Unterschiede gegenüber der parenteralen Zelllinie KiLk-D ($p \geq 0,05$). Die E2F1-Knockdownzelllinien von KiLk-K zeigten ebenfalls einen signifikanten Invasivitätsverlust. Im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte sich ihre Invasivität auf ca. 7 bzw. 11% ($p \leq 0,05$). Die Kontrollzelllinie KiLk-K sh.control zeigte das gleiche Invasivitätsverhalten wie die parentale Zelllinien KiLk-K ($p \geq 0,05$).

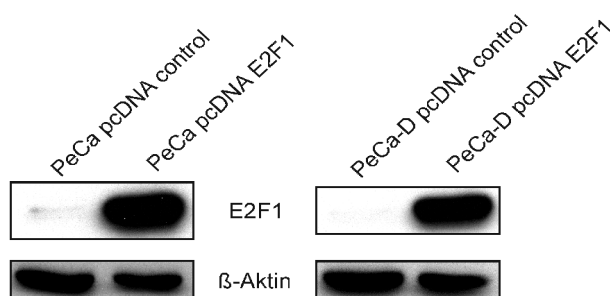
Zusammenfassend konnte so gezeigt werden, dass ein gezielter E2F1-Knockdown in den Lymphknotenmetastasenzelllinien zu einer verminderten Invasivität im Boyden-Chamber führt.

3.3.5 Zunahme des invasiven Potentials von Peniskarzinomzellkulturen durch ektope E2F1-Expression

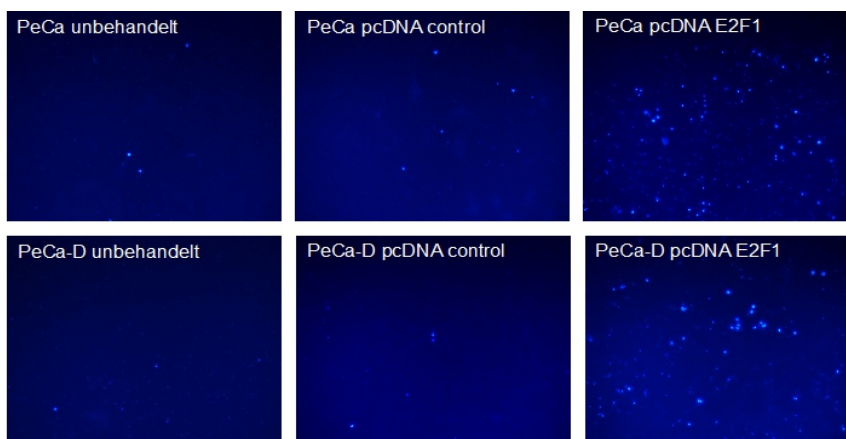
Im vorherigen Experiment konnte die Abhängigkeit der Invasivität durch E2F1 in den Lymphknotenmetastasenzelllinien bereits gezeigt werden. Im Gegensatz dazu müsste nun eine Erhöhung der E2F1-Expression in den Primärtumorzelllinien zu einer Steigerung der Invasivität führen. Dazu wurden die Primärtumorzelllinien PeCa und PeCa-D mit einem

E2F1 Expressionsplasmid transfiziert (siehe 2.2.3.3). Als Negativkontrolle wurde eine Transfektion mit einem Leervektor durchgeführt. Am Vortag wurden 1×10^6 Zellen auf 10 cm Zellkulturplatten ausgesät. Pro Transfektion wurden 6 μ l TurboFect™ und 3 μ g Plasmid (pcDNA 3.1 Leerkontrolle oder pcDNA3.1 E2F1) verwendet. Das Plasmid pcDNA3.1 E2F1 ist ein laboreigener Expressionsvektor und stand bereits zur Verfügung. Die Transfektionsansätze wurden jeweils mehrfach durchgeführt, um zusätzlich Zellen für Western Blots und XTT-Assays zu gewinnen. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion trypsinisiert und für die Boyden-Chamber-Assays, XTT-Assays und Western Blots verwendet. Bei den Boyden-Chamber-Assays wurden 1×10^5 Zellen in Triplets auf 6-Well-Zellkulturplatten in KGM ausgesät. Der chemotaktische Gradient wurde durch ein Konzentrationsgefälle mit SupplementMix des KGM Mediums aufgebaut.

A)



B)



C)

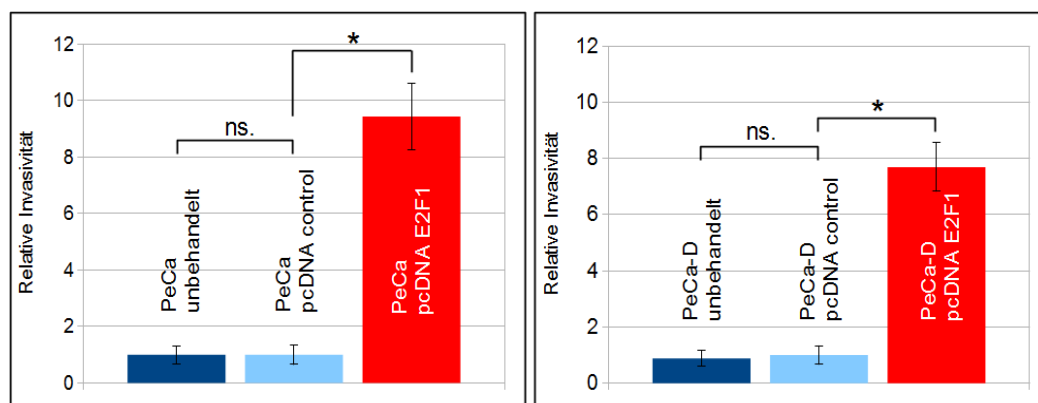


Abb. 19: Boyden-Chamber bei E2F1-Überexpression. A) Western Blot der E2F1-Expression, B) Beispielhafte Darstellung der mit DAPI gefärbten, migrierten Zellen, C) Relative Invasivität der Zelllinien. * signifikant nach T-Test ($p \leq 0,05$), ns. nicht signifikant nach T-Test ($p \geq 0,05$).

Bei den Zelllinien, bei denen eine Überexpression von E2F1 erfolgte, zeigte sich eine signifikante Steigerung der Invasivität. Im Einzelnen erhöhte sich die relative Invasivität der Primärtumorzelllinie PeCa durch E2F1-Expression um das 9,4-fache und bei PeCa-D um das 7,7-fache der Kontrollen. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant ($p \leq 0,05$). Der Unterschied der Invasivität zwischen den jeweiligen Kontrollzelllinien und den unbehandelten Zelllinien war hingegen statistisch nicht signifikant ($p \geq 0,05$). Zusammenfassend konnte eine deutliche Steigerung der Invasivität durch E2F1 Überexpression in den Primärtumoren gezeigt werden.

3.3.6 Charakterisierung der Proliferation mittels XTT-Assay

Um einen Einfluss der Proliferation auf die relative Invasivität im Boyden-Chamber-Assay oder der Messung der Zytostatikaresistenz auszuschließen, wurden Proliferationsassays durchgeführt. Bei dem XTT-Assay wurde die Menge an verstoffwechseltem XTT-Formazan gemessen und als Maß für den Anteil vitaler, stoffwechselaktiver Zellen genommen. Bei der Proliferationsmessung wurden 5×10^3 Tumorzellen auf 48-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Es wurden pro Zelllinie jeweils drei Ansätze für die Messung nach 24, 48 und 72 h vorbereitet (siehe Abb. 20).

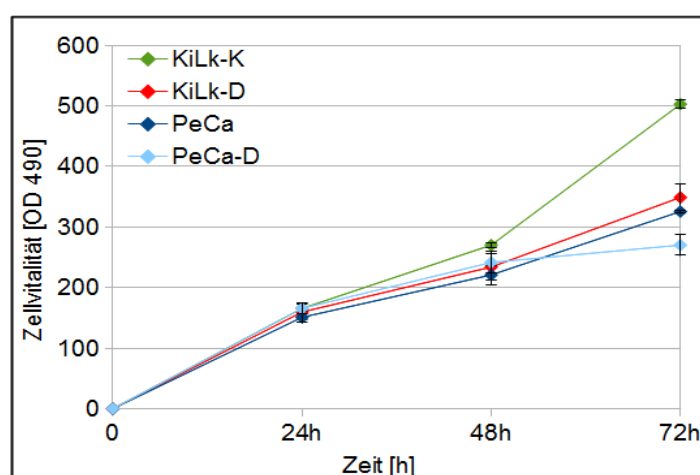


Abb. 20: Charakterisierung der Proliferation mittels XTT-Assay. Die Zellvitalität ermittelt durch die zunehmende Lichtabsorption bei 490 nm wurde gegen die 3 Messzeitpunkte aufgetragen.

Die Proliferation wurde nach 24, 48 und 72 h gemessen. Zu den Zeitpunkten der Zytostatikaresistenzmessung (24 und 48 h) sowie zum Zeitpunkt der Invasivitätsmessung

(48 h) war das Proliferationsverhalten der Tumorzelllinien gleich. Nach 24 h zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der Vitalität der verschiedenen Tumorzelllinien. Der Vitalitätszuwachs lag bei KiLk-D bei 59 %, bei KiLk-K bei 65 %, bei PeCa bei 51 % und bei PeCa-D bei 65%. Nach 48 h zeigte sich ein Vitalitätszuwachs von 63 % bei KiLk-K, von 46 % bei KiLk-D, von 46 % bei PeCa-D und von 45 % bei PeCa. Erst nach 72 h zeigten sich deutliche Unterschiede in der Proliferationsgeschwindigkeit der Zelllinien. Bei der Messung nach 72 h zeigte sich eine Vitalitätszunahme von 49 % bei KiLk-D, von 86 % bei KiLk-K, von 47 % bei PeCa und von 12 % bei PeCa-D.

3.3.7 Proliferations-Assays bei E2F1 Knockdown und Überexpression

Da in vorherigen Experimenten ein deutlicher Invasivitätsunterschied durch E2F1 Expression gezeigt werden konnte, wurde nun der eventuelle Einfluss auf die Zellproliferation überprüft. Die Zellproliferationsgeschwindigkeit nimmt in hohem Maße Einfluss auf die Funktionsuntersuchung der Zellkulturen. Durch eine stark unterschiedliche Proliferationsrate werden die Ergebnisse der Invasivitätsmessungen mit dem Boyden-Chamber-Assay und die Zytostatresistenzmessungen durch FACS oder XTT-Assay verfälscht. Zudem wird der Transkriptionsfaktor E2F1 in gesunden Zellen vielfach in Zusammenhang mit dem Zellzyklus genannt. Eine Überprüfung der Proliferationsrate nach E2F1-Knockdown und ektopter E2F1 Überexpression war deshalb notwendig. Verwendet wurden die Lymphknotenmetastasenzelllinien KiLk-D und KiLk-K mit stabil gehaltenen E2F1-Knockdown (siehe 3.3.2.2 und 3.3.4) aus den vorausgegangenen Experimenten und die Primärtumorzelllinien PeCa und PeCa-D mit ektopter E2F1-Expression durch Transfektion (siehe 3.3.5). Zusätzlich wurden die parentalen Lymphknotenmetastasenzellen und Primärtumorzellen als Negativkontrolle verwendet. Wie auch im vorherigen Versuch wurden jeweils 5×10^3 Tumorzellen auf 48-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Es wurden jeweils drei Ansätze für die Messung nach 24 und 48 h vorbereitet (siehe Abb. 21).

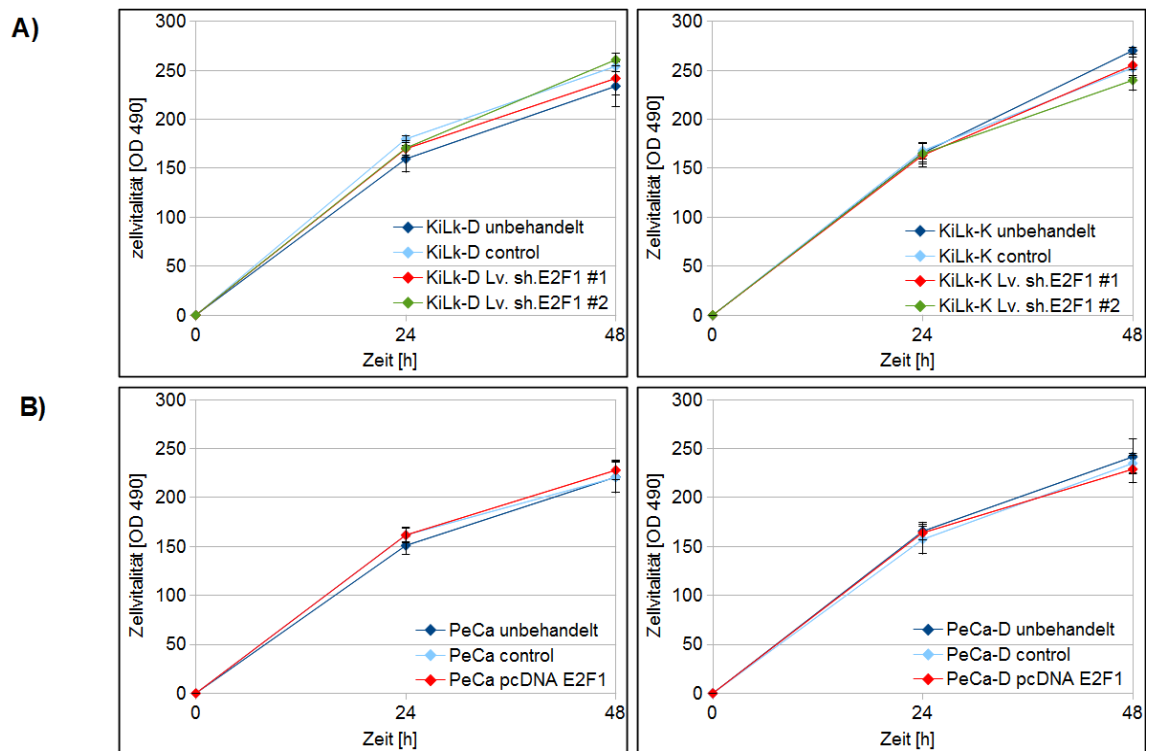


Abb. 21: XTT-Proliferations-Assays bei E2F1-Knockdown und Überexpression. A) XTT-Assay der E2F1-Knockdownzelllinien mit Kontrollzelllinien (KiLk-D und KiLk-K). B) XTT-Assay der Zelllinien PeCa und PeCa-D bei E2F1-Überexpression mit Kontrollen.

Die Zellen, bei welchen mittels lentiviraler Transduktion E2F1 depletiert worden war, proliferierten ebenso schnell wie die Kontrollzelllinien. Unterschiede zwischen den Kontrollzelllinien und den parentalen Zelllinien waren nicht signifikant ($p \geq 0,05$). Auch die Metastasenzelllinien mit stabilem E2F1-Knockdown zeigten keine signifikanten Unterschiede bei der Proliferationsrate ($p \geq 0,05$). Die unterschiedlichen sh.RNAs die zur stabilen Transduktion der Lymphknotenmetastasenzellen verwendet wurden und sich gegen unterschiedliche Zielsequenzen in der E2F1 mRNA richteten, führten nicht zu einer Beeinflussung der Proliferationsgeschwindigkeit. Außerdem zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationsgeschwindigkeit von E2F1-überexprimierenden Primärtumorzellen, den parenteralen Zelllinien sowie den Kontrollzelllinien ($p \geq 0,05$). Auch die Kontrollzelllinien, welche mittels Leervektor transfiziert worden waren, zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber den parentalen Primärtumorzellen ($p \geq 0,05$).

Zusammenfassend ergaben sich keine Proliferationsunterschiede durch E2F1-Überexpression oder Knockdown in den untersuchten Tumorzelllinien. Eine Beeinflussung

der zellkulturellen Funktionsuntersuchungen durch eine unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeit ist demnach unwahrscheinlich.

4 Diskussion

Maligne Tumoren sind durch verschiedene parallel oder nacheinander verlaufende Prozesse charakterisiert [1]. Diese grundlegenden Prozesse beinhalten den Erhalt von proliferationsfördernden Signalen, die Unterdrückung proliferationshemmender Signale, den Widerstand gegenüber Apoptose induzierender Signale mit nachfolgender replikativer Unsterblichkeit, die Induzierung der Angiogenese und die Aktivierung der Invasion und Metastasierung [1]. Während des Fortschreitens maligner Läsionen summieren sich diese Prozesse, wodurch die Aggressivität der Tumorzellen zunimmt [1]. Einer der bedeutendsten Prozesse während dieser malignen Progression ist die Fähigkeit der Tumorzellen zur aktiven, invasiven Fortbewegung im Rahmen der Metastasierungskaskade [1]. Eine Schlüsselrolle kommt dabei der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) zu, da die Tumorzellen durch dieses zelluläre Programm die Fähigkeit zu aktiver Fortbewegung und Gefäßinvasion erhalten [10]. Dieses Programm wird nach abgeschlossener Extravasation in umgekehrter Weise rekapituliert und als Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET) bezeichnet [10]. Aggressivitätssteigernde Eigenschaften während der Pathogenese des Peniskarzinoms sind durch therapieresistentes Verhalten nach erfolgter lymphogener Metastasierung gekennzeichnet [63]. Gleichzeitig ist das aktuelle Wissen über die molekularen Veränderungen während der malignen Progression und der Metastasierung dieses hochmalignen Tumors sehr begrenzt [122]. Ziel dieser Arbeit war es die aggressivitätssteigernden Faktoren zu untersuchen, und die molekularen Veränderungen des Peniskarzinoms während der malignen Progression zu beleuchten. Der Transkriptionsfaktor E2F1 steht dabei im Zentrum unseres Interesses, da seine metastasierungsfördernde Wirkung bereits in anderen Zellkulturen und Mausmetastasierungsmodellen nachgewiesen wurde [32], [96]–[98]. Der Transkriptionsfaktor E2F1 bewirkt beispielsweise eine Verstärkung der Angiogenese in Melanomzellen durch die direkte Regulation der Gene von VEGFR-3 und dessen Liganden VEGF-C [98]. Zudem wurde bereits gezeigt, dass E2F1 in dereguliertem Zustand, zellkontextabhängig eine Zytostatikaresistenz aufbauen kann [96]. Weiterhin reguliert E2F1 in Melanomzellen direkt EGFR wodurch die Invasivität der Tumorzellen erhöht wird. Eine Beeinflussung der Proliferation findet dabei nicht statt [97]. Auch die Tumorzellextravasation wird durch E2F1 beeinflusst. So wird direkt durch E2F1 der

Rezeptor RHAMM (hyaluronan-mediated motility receptor) aktiviert, der als Koaktivator von E2F1 zu einer Gefäßextravasation von zirkulierenden Tumorzellen führt [32]. Die hier verwendeten Peniskarzinomzelllinien wurden erst 2013 etabliert und von der Kieler Forschungsgruppe von Naumann et al. für eine weitergehende Charakterisierung zur Verfügung gestellt [117]. In früheren Experimenten war der häufige Verlust des Tumorsuppressorgens p16 bei metastasierten Peniskarzinomen beobachtet worden, der auch klinisch zu einer Prognoseverschlechterung führte [80]. Daten zu weiteren Faktoren dieses Signalweges im Peniskarzinom existierten bis jetzt nicht. Daher erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der nachfolgenden Signalkaskade mit Expressionsanalysen der Zielgene wie Zyklin-abhängige Kinasen (*Cyclin dependent kinases*, CdKs), des Tumorsuppressorproteins Rb (Retinoblastoma Proteins) und des Transkriptionsfaktors E2F1. Die Eigenschaften von E2F1 während der Tumorpathogenese sind vielfältig und zellkontextabhängig. Frühere Studien zu E2F1 beschreiben diesen Transkriptionsfaktor als Tumorsuppressor, der maßgeblich an der Regulation der Zellproliferation und der Apoptoseinduktion nach DNA-Schädigung beteiligt ist [123], [124]. Durch neuere Untersuchungen des Instituts für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung in Rostock gefolgt von anderen Forschungsgruppen konnte jedoch gezeigt werden, dass E2F1 in malignen Tumorzellen hauptsächlich aggressivitätssteigernde und metastasierungsfördernde Funktion ausüben kann. Diese Funktion beinhaltet beispielsweise eine Steigerung der EMT [125], Zellmigration, Invasivität [97], der Angiogenese [98] und Extravasation [32] sowie der Zytostatikaresistenz [96]. Das Peniskarzinom ist eine sehr aggressive Tumorentität, die sich nach Metastasierung durch eine sehr schlechte Prognose auszeichnet [122]. Zudem wurde in vorausgegangenen Untersuchungen der Verlust des Tumorsuppressorgens p16 beim Peniskarzinom mit einer erhöhten Tumoraggressivität assoziiert [80]. Die Deregulation des RB/E2F-Signalweges durch einen funktionellen Verlust der Tumorsuppressorgene wie p16 wäre eine mögliche Erklärung für eine derartige Aggressivitätssteigerung der Tumorzellen nach Metastasierung. Zusammenfassend folgen die grundlegenden Fragen dieser Arbeit. Ist E2F1 an der malignen Progression und der schlechten Therapierbarkeit des metastasierten Peniskarzinoms beteiligt? Welche funktionellen Eigenschaften der Tumorzellen werden durch E2F1 reguliert und durch welche Mechanismen geschieht dies?

4.1 Der Rb/E2F-Signalweg

Der RB/E2F Signalweg wird bei gesunden Zellen häufig im Rahmen der Regulation des Zellzyklus und der Proliferation beschrieben [87]. Im Gegensatz dazu kann dieser Signalweg in Tumorzellen eine tumorprogressive Wirkung entfalten [97]. Eine Überprüfung dieser stark zellkontext abhängigen Wirkung stellte somit einen ersten Schritt bei der Charakterisierung der aus Kiel erhaltenen Peniskarzinomzelllinien dar. Zunächst wurde die Proteinexpression von CdK2 und CdK4, deren Liganden Cyclin D und Cyclin E sowie von inaktivem phosphorylierten RB und E2F1 untersucht. Dabei zeigte sich im Gegensatz zu den Primärtumoren und gesundem Vorhautgewebe eine deutliche Zunahme dieser Proteine in den Lymphknotenmetastasen. Auffallend war außerdem eine signifikante Korrelation zwischen den CdKs, Cyclinen, pRB und E2F1. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Deregulation der CdK/Rb Signalkaskade durch Inhibition von RB zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F1 führt. Diese Deregulation wird bei einer Vielzahl anderer Tumorentitäten beobachtet, jedoch häufig nur in Zusammenhang mit einer Beeinflussung der Proliferation [89]. Der Grund für die Deregulation des Rb/E2F-Signalweges beim Peniskarzinom könnte die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16 durch LOH-Mutation oder Promoter Hypermethylierung sein [122], die häufig beim fortgeschrittenen Peniskarzinom beobachtet wurde [80], [126], [127]. Der Verlust anderer Tumorsuppressorgene konnte auch auf den Chromosomen 2q, 6p, 8q, 9p, 12q und 17p13 nachgewiesen werden [82]. Mutationen in diesen Bereichen korrelierten dabei auffällig häufig mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen [82]. Diese Mutationen könnten also das Resultat einer genetischen Instabilität im Verlauf der Tumorprogression darstellen [128]. Die Deregulation des Rb/E2F-Signalweges kann jedoch auch durch Mutation des übergeordneten *Epidermal growth factor receptors* (EGFR) entstehen [129]. Dabei führt dessen Aktivierung zu einer verstärkten Expression der CdKs und Cycline mit nachfolgender Aktivierung von E2F1 [130]. Zudem wurde eine hohe EGFR-Expression in Peniskarzinomen beobachtet [131]. In Melanomzellen ist das EGFR-Gen ein direktes Zielgen von E2F1, wodurch die EGFR-Expression zunimmt [97]. Außerdem ist EGFR Coaktivator von E2F1 wodurch es zur Expression von metastasierungsrelevanten Protoonkogenen wie B-Myb (MYBL2) kommt [97]. B-Myb kann beispielsweise in Brustkrebszellen die EMT durch Snail-Expression einleiten [132]. Ein anderer Mechanismus zur Deregulation des Rb/E2F Signalweges kann jedoch auch die Infektion

mit HPV 16 sein. Das HPV-E7 Protein bewirkt dabei die direkte Inaktivierung des Rb-Proteins und Freisetzung / Aktivierung von E2F1 [122]. HPV-assoziierte Veränderungen an RB oder p16 konnten bei immunhistochemischen Untersuchungen jedoch nur bei einer sehr geringen Anzahl von Patientenproben beobachtet werden [80], [128]. Zudem zeigten sich diese HPV-assoziierten Veränderungen vorzugsweise an seltenen Subtypen, wie dem basaloiden oder dem warzigem Peniskarzinom [80], [128]. Daher werden die durch HPV hervorgerufenen Veränderungen an Tumorsuppressorgenen wohl eher als zusätzlicher Faktor die Deregulation des Rb/E2F Signalweges beeinflussen. Ein weiterer Mechanismus, der zu einer Deregulation des E2F1-Signalweges führt, ist der Einfluss von microRNAs (miRs) auf post-transkriptioneller Ebene [133]. Beispielsweise wurde erst kürzlich die miR-493 identifiziert, die E2F1 in NSCLC-Zellen direkt inhibiert [134]. Als weiteres Beispiel reguliert die miR-205 E2F1 in Metastasenzellen des malignen Melanoms [135]. Funktionelle Verluste solcher inhibitorischer microRNAs wären auch beim Peniskarzinom denkbar, was eine Deregulation der E2F1 Expression begünstigen würde. Alle beschriebenen Mechanismen der Deregulation des RB/E2F-Signalweges haben mit der Aktivierung von E2F1 dieselbe Konsequenz und sind häufig mit einer Prognoseverschlechterung des Patienten assoziiert [136], [137].

4.2 Die EMT in Peniskarzinomzelllinien

Die Epithelial-Mesenchymale Transition ist ein Schlüsselprozess im Rahmen der Metastasierungskaskade [4]. Durch die EMT erhalten die Tumorzellen die Fähigkeit sich aktiv aus einem Zellverbund zu lösen und natürliche Barrieren wie die subepitheliale Basalmembran zu überwinden [4]. Dadurch können Tumorzellen in das Gefäßsystem des Menschen eindringen und Metastasen bilden. Im Zuge der weiteren Charakterisierung der Peniskarzinomzelllinien auf Proteinebene zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen eine Korrelation der E2F1-Expression mit bekannten EMT-Markern wie N-Cadherin und Vimentin. Diese waren wie E2F1 in den Lymphknotenmetastasenzellen stark exprimiert während sie in den Primärtumorzellen nicht nachweisbar waren. Die Expression von E-Cadherin verhielt sich entgegengesetzt dazu. E-Cadherin ist ein Adhäsionsmolekül, das spezifisch nur in epithelialen Zellen vorkommt [10]. In den Primärtumorzellen war es hochreguliert und in den Lymphknotenmetastasenzellen war es nicht nachweisbar. Dies zeigte eine stattgefundene Veränderung des Phänotyps der Tumorzellen von

Primärtumorzellen mit epithelialem Charakter hin zu Tumorzellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Außerdem korrelierten die Level der EMT regulierenden Proteine Slug und RHAMM mit der Expression von E2F1 [26], [32]. Der Transkriptionsfaktor Slug ist ein bekannter Regulator der EMT, der auch für seine apoptoseinhibierende Eigenschaft bekannt ist [26], [27], [138]. Dabei kann Slug die E-Cadherin-Expression hemmen [139]. Dieser Vorgang wird als Schlüsselereignis der EMT betrachtet, da sich dadurch die Tumorzellen aus ihrem epithelialen Zellverbund lösen können [9], [10], [139] und ist eine Voraussetzung für deren Migration/Invasion im Extrazellularraum [9], [10]. Unsere Forschungsgruppe konnte zeigen, dass E2F1 durch die direkte Expression von miR-224/452 die EMT auslösen kann [125]. Als weiteres direktes Zielgen von E2F1 wurde kürzlich der Hyaluronsäurerezeptor RHAMM identifiziert [32]. E2F1 kooperiert in der Expression und Sekretion von Fibronectin in den Extrazellularraum mit RHAMM [32]. Die Fibronectinsekretion ist Ausdruck einer Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix durch die sogenannte „lokale Nischen“ entstehen [32]. In diesen „lokalen Nischen“ ist die Struktur natürlicher Barrieren der Metastasierung wie beispielsweise der Basalmembran beeinträchtigt, wodurch die EMT gefördert wird [140]. Fibronectin wird daher auch häufig als Marker der EMT beschrieben [141]. RHAMM kann als Mediator und Coregulator von E2F1 durch die Fibronectinsekretion die Zellmigration und Extravasation zirkulierender Tumorzellen fördern. [32]. Als Mechanismus dafür wurde die Fibronectin vermittelte Aktivierung von Integrin- β 1 angegeben, welche den FAK-Signalweg (*focal adhesion kinase*) aktiviert. Dieser FAK-Signalweg ist für seine migrationssteigernde Wirkung bekannt [142]. Eine weitere Möglichkeit zur Auslösung der EMT ist die Entstehung einer hypoxischen Stoffwechselsituation in den Tumorzellen [143]. Die EMT wird in diesem Fall durch HIF1- α induziert [143]. Das HIF1- α Molekül ist eines der wichtigsten Sensoren der zellulären Sauerstoffversorgung, die bei aggressiv wachsenden Tumoren durch mangelnde Gefäßversorgung entsteht [144]. Die bekanntesten Zielgene von HIF1- α sind dabei die Angiogenese auslösende Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie (*vascular endothelial growth factor*), der Glukosetransporter Glut1 und der Transkriptionsfaktor ZEB1 [143], [145]. Die Expression von HIF1- α war in den Lymphknotenmetastasen deutlich erhöht und korrelierte mit der Expression von E2F1. In den Primärtumorzellen ließ sich kein HIF1 α nachweisen. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen einer starken E2F1 Expression und HIF1- α ist folglich möglich. Die

Unterschiede der Expression der EMT assoziierten Proteine bestätigten die generelle Charakterisierung der Tumorzellen von Naumann *et al.* als Primärtumor- und Metastasenzellen [117]. In weiteren Versuchen durch E2F1-Knockdown in den Lymphknotenmetastasen und mittels E2F1-Überexpression in den Primärtumorzellen wurde die Regulierbarkeit von N-Cadherin, Vimentin und Slug durch E2F1 gezeigt. Als Positiv-Kontrolle wurde das Cyclin E Protein mitbestimmt. Cyclin E wurde bereits als direktes Zielgen von E2F1 identifiziert [119]. Cyclin E aktiviert E2F1 durch den Cdk2/Rb Signalweg [119]. Durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus wird Cyclin E wiederum durch E2F1 induziert [119]. Der Nachweis dieses funktionellen Zusammenhangs beim Peniskarzinom ist jedoch neu. Die E2F1-Überexpression in den Primärtumorzellen führte zu einer Expressionssteigerung der Proteine N-Cadherin, Vimentin und Slug. Der E2F1-Knockdown in den Lymphknotenmetastasenzellen führte wiederum zu einer Expressionsminderung dieser EMT assoziierten Proteine. Somit zeigte sich in diesem Zellsystem ein Zusammenhang zwischen E2F1 und den Markern der Epithelial-Mesenchymalen Transition. Es ist daher wahrscheinlich, dass die E2F1-induzierte Regulation dieser EMT-Marker auch einen Einfluss auf das Verhalten der Zellkulturen in Funktionsuntersuchungen hat.

4.3 Funktionelle Eigenschaften der Zellkulturen

Der Erhalt proliferativer Signale und die Unterdrückung proliferationssupprimierender Signale gelten als kennzeichnende Fähigkeit der Tumorentwicklung [1]. Durch die unkontrollierte Proliferation wird die Architektur und Homöostase des Gewebes gestört und aufgelöst [1]. Die E2F-Transkriptionsfaktoren wurden ursprünglich im Rahmen der Zellproliferation beschrieben [123]. Dieser Zusammenhang wird jedoch seit Jahren kontrovers diskutiert, da Untersuchungen die Notwendigkeit der E2Fs für eine anhaltende Zellteilung in Frage stellten [89]. Bei Untersuchung der Proliferation der Peniskarzinomzellen mit der XTT-Methode zeigte sich, dass die Lymphknotenmetastasenzellen und die Primärtumorzellen nahezu gleichmäßig schnell proliferierten. Minimale Unterschiede ergaben sich erst nach einer Beobachtungszeit von 48 bis 72 Stunden. Die Funktionsuntersuchungen zur Messung der Invasivität und Zytostatikaresistenz wurden jedoch nach 24 oder 48 Stunden durchgeführt, sodass ein Einfluss der Proliferation zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen werden kann.

Interessanterweise hatte der E2F1 Knockdown in den Lymphknotenmetastasenzellen und die E2F1 Überexpression in den Primärtumorzellen keinen messbaren Einfluss auf die Proliferation. Diese Ergebnisse bekräftigen die These, dass E2F1 in diesen Tumorzellen nicht für eine anhaltende Zellteilung notwendig ist und deren Teilungsrate nicht beeinflusst. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits an retinalen Progenitorzellen der Maus durchgeführt [146]. Dabei zeigte sich, dass diese Zellen auch bei Verlust des aktivierenden E2F1 noch in der Lage waren sich zu teilen [146]. Als Ursache dafür wurde die Übernahme der proliferationsregulierenden Eigenschaften durch das *N-Myc proto-oncogene Protein* (N-Myc) beschrieben [146]. Auch in malignen Melanomzellen konnte diese Beobachtung gemacht werden. Dabei zeigte sich, dass der gezielte Knockdown von E2F1 keinen Einfluss auf die Proliferation hat [97]. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die ursprünglich beschriebene Funktion von E2F1 durch andere aktivierende E2Fs kompensiert wird, da mehrere Untersuchungen komplexe Interaktionen zwischen den einzelnen E2Fs während der Proliferation nahe legen [89]. So konnte bei Versuchen mit Knock-in Mäusen gezeigt werden, dass die aktivierenden E2Fs teilweise die selbe proliferationsregulierende Funktion haben [147]. Andererseits können E2F7 und E2F8 jeweils die Funktion von E2F1 während des Zellzyklus hemmen [148]. Als maßgeblicher Transkriptionsfaktor für den Übergang der Tumorzellen von der G1 in die S Phase wird hingegen der Transkriptionsfaktor E2F3a beschrieben [147], [149]. Dieses Netzwerk aus verschiedenen E2Fs, die auch noch durch andere Einflüsse wie microRNAs [133] reguliert werden ist bis jetzt nur unzureichend verstanden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Ebenso wie die Proliferation gilt auch die Fähigkeit zu invasivem Wachstum als kennzeichnende Eigenschaft während der Tumorentwicklung [1]. Das invasive Wachstum ist außerdem Teil der Metastasierungskaskade, die bei fortschreitender Tumorprogression beobachtet werden kann [1]. Zur Untersuchung der Invasivität wurden die Tumorzellen mit der Boyden-Chamber-Methode charakterisiert. Dabei zeigten beide aus Lymphknotenmetastasen etablierten Zelllinien ein signifikant stärkeres invasives Wachstum als die Zellen aus Primärtumoren. Diese Zunahme der Invasivität lässt sich durch den mesenchymalen Phänotyp erklären, durch den die Zellen die Fähigkeit zur Lösung aus dem epithelialen Zellverbund und zur aktiven Migration gewonnen haben [4]. Es bestand eine Korrelation zwischen der Invasivität und der Höhe der E2F1-Expression. Bei nachfolgenden in vitro- Funktionsuntersuchungen zeigte sich die Beeinflussung des

invasiven Wachstums dieses Zellsystems durch E2F1 Knockdown oder Überexpression. So führte der E2F1-Knockdown in den Lymphknotenmetastasenzellen zu einem signifikanten Invasivitätsverlust, und umgekehrt die E2F1-Überexpression in den Primärtumorzellen zu einer signifikanten Steigerung der Zellmigration. Der Transkriptionsfaktor E2F1 hat folglich einen Einfluss auf die Invasivität der Peniskarzinomzellen, was durch direkte oder indirekte Regulation EMT-relevanter Faktoren bewirkt werden könnte. Hinweisend auf eine direkte Regulation von Vimentin durch E2F1 besteht aufgrund der nachgewiesenen Bindung von E2F1 an die Promotorregion des Vimentingens mit nachfolgender Expressionssteigerung im Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) [150], [151]. Eine indirekte Regulation mehrerer EMT-Marker könnte auch durch Expression des Transkriptionsfaktors Slug erfolgen, da dieser für die Regulation der EMT bekannt ist [26]. Für eine Slug vermittelte Regulation der EMT durch E2F1 existieren bis jetzt nur Hinweise. In Mammakarzinomzellen wurde beispielsweise beobachtet, dass der Verlust des RB-Proteins zur EMT Induktion mit Herunterregulation von E-Cadherin und einer Expressionssteigerung der EMT induzierenden Transkriptionsfaktoren wie Slug und ZEB-1 führt [152]. Ein gezielter Rb-Knockdown erhöhte außerdem signifikant die Invasivität der Mammakarzinomzellen mit der Boyden-Chamber-Methode [152]. Als Ursache dafür wurde eine Induktion von Filopodien (Untergruppe von Pseudopodien) und Stressfasern (Kontraktile Elemente der Zellteilung und Fortbewegung) beschrieben [152]. Diese Beobachtungen könnten durch eine nachfolgende Expressionssteigerung von E2F1 durch Rb-Verlust oder Inaktivierung erklärt werden. Ebenfalls zeigten Versuche mit Melanomzellen, dass ein gezielter E2F1-Knockdown eine Expressionssteigerung von E-Cadherin bewirken kann [97].

Eine weitere Erklärung für die E2F1 vermittelte Regulation der Invasivität ist die Beeinflussung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) [153], [154]. So konnte in früheren Arbeiten mit NSCLC-Zellen eine direkte Regulierbarkeit der MMP-Expression durch E2F1-Knockdown oder Überexpression gezeigt werden [153]. Ein E2F1-Knockdown in diesen NSCLC-Zellen führte dabei ebenfalls zu einer Abnahme der Invasivität in *in vitro* Experimenten [153]. Ebenso zeigte eine andere Arbeitsgruppe die Regulation mehrerer MMPs durch E2F1 in SCLC-Zellen [154]. Solche MMPs bewirken den Abbau von extrazellulärer Substanz, was den Durchbruch maligner Zellen durch die Basalmembran im Rahmen der EMT ermöglicht [155]. Dieser Vorgang schafft somit auch die

Voraussetzungen für die Lösung einzelner Zellen aus dem Tumorzellverbund im Rahmen der beginnenden EMT. Die generelle Regulierbarkeit der Invasivität durch E2F1 konnte auch bei malignen Melanomzellen gezeigt werden [97]. So bewirkte ein gezielter E2F1-Knockdown eine Abnahme der Migrationsfähigkeit und der EGFR-Expression [97]. EGFR wiederum aktiviert unter anderem die Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/AKT) und MAP-Kinase (MAPK/ERK) Signalwege sowie diverse Kernsignalkaskaden, die mit Invasivität und Metastasierung assoziiert werden [85]. Zudem ist EGFR häufig im Peniskarzinom überexprimiert [156]. Der zugehörige Ligand EGF kann außerdem im Mammakarzinom, dem Plattenepithelkarzinom der Zunge und im Cervixkarzinom die EMT auslösen [157]–[159]. Hieraus ergibt sich wiederum ein möglicher Zusammenhang zwischen E2F1 und der EMT. Eine allgemeine Regulierbarkeit der Invasivität durch E2F1 konnte auch in NSCLC-Zellen beobachtet werden [134]. Ebenso zeigte sich beim Vergleich der Genexpression von Patientenproben des superfiziellen und invasiven Blasenkarzinoms eine signifikante Expression von E2F1 und mehreren Zielgenen, welche mit invasivem Tumorphänotyp assoziiert sind [103].

Über die Invasivitäts- und EMT-regulierenden Faktoren beim Peniskarzinom existieren bis heute extrem wenig Daten [128]. Aus immunhistochemischen Untersuchungen ist jedoch der häufige Verlust von E-Cadherin und die Überexpression von MMP-9 mit einem signifikant höheren Auftreten von Lymphknotenmetastasen assoziiert worden [15]. Außerdem wurde immunhistochemisch das gehäufte Auftreten von Annexin-4 in der Nähe der Invasionsfront nachgewiesen, welches signifikant mit den Lymphknotenmetastasen korrelierte [160]. Annexine sind Phospholipid-bindende Proteine, die Invasivität und Migration im metastasierenden Plattenepithelkarzinom regulieren [161]. Funktionelle Zusammenhänge konnten jedoch ohne geeignetes *in-vitro*-Zellsystem bisher nicht direkt untersucht werden. Daher war die Etablierung der Peniskarzinomzelllinien von Naumann et al. [117] für die Untersuchung dieser Tumorentität überaus wichtig. Weitere Untersuchungen zur Klärung des molekularen Kontext zwischen Primärtumorzellen und metastasierten Zellen des Peniskarzinoms müssen sich anschließen.

4.4 E2F1 und die Zytostatikaresistenz

Abgesehen von der Steigerung der Invasionsfähigkeit bewirkt die EMT auch eine Zunahme der Resistenz gegenüber Apoptoseauslösenden Faktoren [4]. In den durchgeführten Versuchen mit stabilem oder transientem E2F1-Knockdown in den Lymphknotenmetastasenzellen zeigte sich eine deutliche Sensibilisierung gegenüber zytostatischen Medikamenten wie Cisplatin oder Paclitaxel. Der Wirkstoff Cisplatin wirkt dabei über eine direkte Schädigung der Zell-DNA, woraufhin Apoptose eingeleitet wird [162]. Paclitaxel hingegen bewirkt eine Hinderung der Reorganisation der Mikrotubuli während der Zellteilung [163]. In dem untersuchten Zellsystem bewirkt die E2F1-Expression also wahrscheinlich eine Resistenz gegenüber zwei Zytostatika mit vollkommen unterschiedlicher Wirkungsweise. Als Erklärung dafür könnte abermals der aggressive, mesenchymale Phänotyp der Lymphknotenmetastasenzellen herangezogen werden, der durch E2F1 hervorgerufen wird. Beispielsweise bewirkt der Transkriptionsfaktor Slug in Mammakarzinomzellen, mit Hilfe der Regulation des Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/AKT) Signalweges durch den Tyrosin Proteinkinase Rezeptor UFO (auch AXL), eine Steigerung der Zytostatikaresistenz [138]. Eine weitere Wirkungsweise von Slug in Mammakarzinomzellen ist die direkte Unterdrückung des apoptotisch wirkenden Gens PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*, auch Bbc3 genannt) [164]. Außerdem induziert N-Cadherin eine Steigerung der Zytostatikaresistenz in Melanomzellen [17]. Durch die zuvor gezeigte E2F1-vermittelte Regulation von Slug und N-Cadherin wären derartige Mechanismen auch im Peniskarzinom denkbar.

Außer der EMT-induzierten Zytostatikaresistenz wurden aber auch mehrere andere Mechanismen der Resistenzentwicklung beschrieben, die durch E2F1 reguliert werden. E2F1 kann beispielsweise DNp73 induzieren, welches die pro-apoptotischen Tumorsuppressorproteine p53 [115] und p73 sowie dessen Target miR-205 inhibiert [116]. Die Proteine p53 und p73 inhibieren in gesunden Zellen die Expression von *ATP-binding cassette Transporters A2 / A5* (ABCA2/5) und Bcl-2, welche für die Ausbildung einer Zytostatikaresistenz bekannt sind [116]. Die Eigenschaften von E2F1 hinsichtlich der Zytostatikaresistenz sind prinzipiell zellkontextabhängig und nicht vollständig verstanden. Beispielsweise wurde beschrieben, dass E2F1 durch p53 in einigen Zellen Apoptose auslösen kann [95]. Andererseits zeigte sich in neueren Versuchen, dass durch

genotoxische Substanzen Komplexe aus p53 und E2F1 entstehen, die einen hemmenden Einfluss auf die Einleitung der p53-abhängigen Apoptose haben [165]. Die Situation verändert sich nochmals bei Mutation des p53 Gens. Es wurde kürzlich gezeigt, dass unter Zytostatikabehandlung, E2F1 zusammen mit p73 das mutierte p53 Gen aktivieren kann [166]. Als Resultat daraus ergab sich eine erhöhte Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Substanzen [166]. Bei der Untersuchung des p53-Proteins in den Peniskarzinomzellen zeigte sich in den Primärtumorzellen eine starke p53-Expression durch den Pab 1620 Antikörper. Die p53-Expression in den Lymphknotenmetastasenzellen war hingegen deutlich schwächer. Der Pab 1620 anti-p53-Antikörper weißt selektiv Wildtyp p53 nach. Die geringe p53-Expression in den Lymphknotenmetastasenzellen könnte ein Hinweis auf eine *loss-of-heterozygoty* Mutation im Rahmen der Metastasierung sein. Bei Prostatakarzinomzellen kann beispielsweise nach p53 Verlust eine Zunahme der Invasivität beobachtet werden [167]. Außerdem kann der Verlust von p53 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber apoptotischer Signale führen [168]. In Bezug auf das Peniskarzinom zeigten immunhistochemische Untersuchungen an Patientenproben weiterhin, dass die Expression von mutiertem p53 das Ansprechen auf zytostatische Behandlung vermindert [169], [170]. Für eine sichere Beurteilung der Rolle von E2F1 in Hinblick auf p53-Mutationen mit konsekutiver Zytostatikaresistenz sollten also weitere Untersuchungen mit umfangreicherem Patientenkollektiv erfolgen.

An dieser Stelle muss aber auch darauf hingewiesen werden, dass die starken Unterschiede in der Zytostatikaresistenz der Lymphknotenmetastasenzellen, verglichen mit den Primärtumorzellen nicht allein durch E2F1 zu erklären sind. Die Lymphknotenmetastasenzellen benötigten etwa die 3-4 fache Dosis derjenigen, die bei Primärtumorzellen einen annähernd hundertprozentigen Vitalitätsverlust bewirkte. Es kann also davon ausgegangen werden, dass noch weitere Mechanismen der Zytostatikaresistenz in den Lymphknotenmetastasenzellen aktiviert werden, die von E2F1 unabhängig sind.

4.5 Vergleich der verschiedenen Zytostatika

Beim Vergleich der verschiedenen Zytostatika, die zur Charakterisierung der Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Substanzen eingesetzt wurden, zeigten sich weitere interessante Unterschiede. Paclitaxel, bewirkte im XTT-Assay und im FACS einen viel stärkeren Vitalitätsverlust als Cisplatin. Generell konnte bei den Versuchen nur mit

Paclitaxel ein annähernd hundertprozentiger Vitalitätsverlust nachgewiesen werden. Bei Cisplatin gelang dies nur bei den Primärtumorzellen, mit einer ca. 40-50 fachen Dosis von Paclitaxel. Da Cisplatin und Paclitaxel in der klinischen Therapie (modifiziertes Therapieschema nach Pizzocaro) annähernd gleich dosiert werden [63], ist ein direkter Vergleich möglich. Diese Beobachtung bei *in vitro* Experimenten bestätigt statistische Erhebungen bei denen Paclitaxel eine überlegene Wirkung gegenüber Cisplatin hat [68]. Die Wirkung von 5-Fluoruracil stellte sich hingegen als unzureichend heraus. Die experimentelle Dosis wurde entsprechend der klinischen Dosierung um den Faktor 10 angepasst. Trotzdem konnte bei keiner Dosis eine Vitalitätsminderung von mehr als ca. 30 % erreicht werden. Der direkte Vergleich zu Cisplatin und Paclitaxel ist allerdings schwierig, da 5-Fluoruracil über 3 Wochen mit jeweils 4 Tagen verabreicht wird. Generell lässt jedoch der minimale Effekt von 5-Fluoruracil Zweifel an der Wirksamkeit dieses Präparats entstehen, da Therapieschemata nur mit Cisplatin und Paclitaxel ähnlich gute statistische Resultate erzielen [171]. Aktuell existiert in Deutschland eine große Bandbreite an verwendeten Zytostatikatherapie-Schemata [70]. Dies zeigt die extreme Unsicherheit bei der Behandlung des fortgeschrittenen Peniskarzinoms, die durch geringe Fallzahlen, einem Mangel an klinischer Erfahrung und einem Mangel an Daten aus großen randomisierten Studien entstanden ist [70]. Zudem sind viele alte Zytostatikatherapieschemata erheblich toxisch, sodass bei alten, multimorbiden Patienten häufig Kompromisse eingegangen werden müssen, die nicht erfolversprechend sind [68]. Das erste weit verbreitete Zytostatikaschema stellte seit 1991 das Dexeus-Schema (bestehend aus Cisplatin, Methotrexat und Bleomycin) dar [172]. Diese Therapieschema bildete durch mangelnde Alternativen lange Zeit das Standardschema [173]. Ein neueres Therapieschema von Pizzocaro (1998) ersetzte Cisplatin durch Vinchristin [174]. Der Einsatz von taxanhaltigen Zytostatika stellte 2008 einen tatsächlichen Fortschritt bei der Behandlung des fortgeschrittenen Peniskarzinoms dar [120]. Die aktuellen Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Urologische Onkologie der deutschen Krebsgesellschaft sprechen sich daher für eine Vereinheitlichung der Zytostatikatherapieschemata bei fortgeschrittenem Peniskarzinom aus [68]. Dafür wird das modifizierte Therapieschema nach Pizzocaro, bestehend aus einer Dreifachkombination aus Paclitaxel, Cisplatin und 5-Fluoruracil empfohlen [74]. Paclitaxel sollte mit 120 mg/m² Körperoberfläche an Tag eins, Cisplatin mit 20 mg/m² Körperoberfläche an Tag eins bis fünf und 5-Fluoruracil mit 1000

mg/m² Körperoberfläche an Tag zwei bis fünf für 3 Wochen verabreicht werden [68]. Diese Empfehlung basiert jedoch nur auf statistischen Erhebungen. Die vorliegende *in-vitro* Testung der Zytostatika an Peniskarzinomzellen ist bislang einzigartig. Durch die Etablierung des Peniskarzinomzelllinien von Naumann *et al.* eröffnen sich nun vollkommen neue Möglichkeiten zum Vergleich der Zytostatika. Das in dieser Arbeit vorgestellte Zellsystem zur Zytostatikatestung könnte Wegbereiter für *in-vivo* Experimente neuer Zytostatika werden.

4.6 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor E2F1 starken Einfluss auf die maligne Progression in Peniskarzinomzellen hat. Die vorliegenden Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Deregulation des CdK/RB Signalweges ursächlich für die Aktivierung von E2F1 in Lymphknotenmetastasen ist. Diese Deregulation könnte durch den häufigen Verlust des Tumorsuppressorgens p16 auf Chromosom 6 mitbedingt sein. Durch E2F1-Knockdown in den Lymphknotenmetastasenzellen mit ursprünglich hoher E2F1-Expression konnte eine Minderung der Invasivität und eine Zytostatikasensibilisierung gegenüber Paclitaxel und Cisplatin nachgewiesen werden. Umgekehrt bewirkte eine E2F1 Überexpression in den Primärtumorzellen mit ursprünglich geringer E2F1-Expression eine Steigerung des invasiven Wachstums. Als Ursache für diese funktionellen Veränderungen wurde die Regulierbarkeit der EMT durch E2F1 identifiziert. Die EMT nimmt bei der Einleitung der Metastasierung der Primärtumorzellen eine Schlüsselrolle ein, da der grundlegende Phänotyp dieser Zellen verändert wird. Diese Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften entwickeln eine Vielzahl von aggressivitätsrelevanten Eigenschaften wie beispielsweise der Fähigkeit zur aktiven Fortbewegung/Invasion oder einem erhöhten Widerstand gegenüber Apoptoseauslösender Faktoren. E2F1 ist also an der Regulation der Tumormetastasierung in diesem Zellsystem beteiligt. Durch die Hochregulation von E2F1 in den Primärtumorzellen wurde keine Apoptose ausgelöst und es erfolgte auch keine Steigerung der Proliferation in den durchgeführten Vitalitätsassays. Auch bewirkte der stabile E2F1-Knockdown keine Änderung der Proliferationsgeschwindigkeit im XTT-Assay. Die aggressivitätssteigernden Effekte von E2F1 sind folglich nicht durch die Änderung der Proliferation zu erklären. Dies bestätigt in den untersuchten Peniskarzinomzelllinien die Befunde aus anderen

Tumormodellen, wonach E2F1 in malignen Läsionen aggressivitätspotenzierende Eigenschaften besitzt, die vollkommen unabhängig von seiner ursprünglich beschriebenen Wirkungsweise sind [89].

Diese Beobachtungen könnten eine klinische Anwendung finden, da die Identifizierung der Patienten mit bereits erfolgter inguinaler Lymphknotenmetastasierung ein wichtiges Problem bei der Therapieplanung des Peniskarzinoms darstellt. Experimente an Tumorpräparaten aus einem größeren Patientenkollektiv könnten relevante Aussagen über den Nutzen der E2F1-Bestimmung in Primärtumorgewebe zur Identifizierung bereits erfolgter Lymphknotenmetastasierung liefern. Aber auch andere molekulare Marker könnten sich dafür eignen. Beispielsweise könnten auch die EMT-Marker wie E-Cadherin, Vimentin und N-Cadherin und die Proteine SLUG, RHAMM und HIF1- α eine bereits erfolgte Metastasierung anzeigen. Möglicherweise könnte auch die Kombination dieser Marker zu einem wertvollen diagnostischen Instrument werden.

Außerdem zeigten die Experimente zur Untersuchung der Zytostatikaresistenz eine extreme Resistenzentwicklung bei den Lymphknotenmetastasenzellen verglichen mit den Primärtumorzellen. Das etablierte *in-vitro*-Peniskarzinom-Modellsystem eignet sich somit also auch hervorragend für zukünftige Untersuchungen der Zytostatikaresistenz. Die einzelnen Zytostatika bewirkten im direkten Vergleich sehr unterschiedliche Vitalitätsverluste. Der Einsatz von Paclitaxel stellte sich gegenüber Cisplatin und 5-Fluoruracil als deutlich wirkungsvoller heraus. Obwohl diese Untersuchungen mit nur insgesamt 4 Zelllinien durchgeführt wurde, ist der Wert dieser Experimente groß, da das Wissen über die zytostatische Behandlung des Peniskarzinoms überaus mangelhaft ist. Festzuhalten ist deshalb die Tatsache, dass alle Peniskarzinomzelllinien *in-vitro* auf eine Behandlung mit Paclitaxel gut ansprachen. Eine weitere therapeutische Fokussierung auf Paclitaxel ist demzufolge sinnvoll.

5 Ausblick

Die EMT ist als Meilenstein der Entwicklung von metastatischen Absiedlungen im Körper beschrieben [1]. Nachdem die Tumorzellen durch dieses zelluläre Programm einen mesenchymalen Phänotyp mit Motilitätssteigerung erhalten haben, ist der nächste Schritt in der Metastasierungskaskade die Invasion des Gefäßsystems des Körpers [175]. Diese Lymphgefäßinvasion ist wiederum mit einer Vielzahl von molekularen Veränderungen verbunden. Beispielsweise ist für die Krebszellen das Überwinden der Perizyten und Endothelzellen, aus denen Kapillaren aufgebaut sind, notwendig, um in das Gefäßlumen vordringen zu können [175]. In Mammakarzinomzellen wurde in diesem Zusammenhang der *Cytokine-Transforming Growth Factor- β* (TGFB) identifiziert, der eine direkte Invasion der Tumorzellen durch die Gefäßkapillaren ermöglicht [176]. Ein funktioneller Gegenspieler dieses Vorgangs ist wiederum der *Amino-terminal enhancer of split* (Aes), der in Kolonkarzinomzellen diese Intravasation verhindert [177]. Ein anderer Mechanismus durch den die Tumorzellen in das Gefäßlumen vordringen können, ist die Neubildung von Lymphgefäßen mit strukturellen Mängeln [175]. Diese durch Tumorzellen neugebildeten Gefäße zeichnen sich durch einen Zustand der ständigen Rekonfiguration aus, der zu gewundenen und häufig undichten Kapillaren führt [178]. Ein zentrales Molekül bei der Neubildung von Gefäßen durch Tumorzellen sind Proteine aus der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) Familie [179]. Diese Familie umfasst fünf Wachstumsfaktoren (VEGF-A/B/C/D/E), die durch Bindung an die drei verschiedenen Tyrosinkinaserzeptoren (VEGF-Rezeptoren, VEGFR 1-3) Angiogenese auslösen können [180]. Diese VEGF-Rezeptoren werden hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert [180]. In neueren Untersuchungen konnte jedoch auch eine erhöhte VEGFR-Expression bei verschiedenen Tumorzellen beobachtet werden [98], [181]. Diese können dabei sogar autokrin durch die ebenfalls exprimierten VEGFR Liganden aktiviert werden [98], [181]. Die Stimulation der VEGF-Rezeptoren führte dabei je nach Tumorentität zu unterschiedlichen aggressivitätssteigernden Eigenschaften [109]. In Zelllinien aus akuten-myeloischen-Leukämiezellen bewirkte eine VEGF-C vermittelte, autokrine Stimulation des VEGF Rezeptors beispielsweise eine Proliferationssteigerung und Zytostatikaresistenz [182]. In Zelllinien des malignen Melanoms führte eine Aktivierung des VEGFR-2 Rezeptors sogar zu einer Steigerung der Migration durch Aktivierung des Integrins $\alpha\beta 3$

[183]. In nun aktuell erschienenen Untersuchungen konnte der direkte Einfluss von E2F1 auf die Neovaskularisation durch VEGF-Proteine gezeigt werden [98]. Dabei wurde VEGFR-3 und dessen Ligand VEGF-C als direktes Zielgen von E2F1 identifiziert [98]. Im Zuge der Charakterisierung der Peniskarzinomzelllinien wurden die Expression der VEGF-Proteine VEGFR-1/3 und VEGF-C untersucht. Außerdem wurde deren Regulierbarkeit durch E2F1-Knockdown und E2F1-Überexpression mit den Zellen aus den vorherigen Versuchen (siehe 3.3.2.1 und 3.3.2.2) überprüft. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in folgender Abbildung dargestellt (siehe Abb. 22 und Abb. 23).

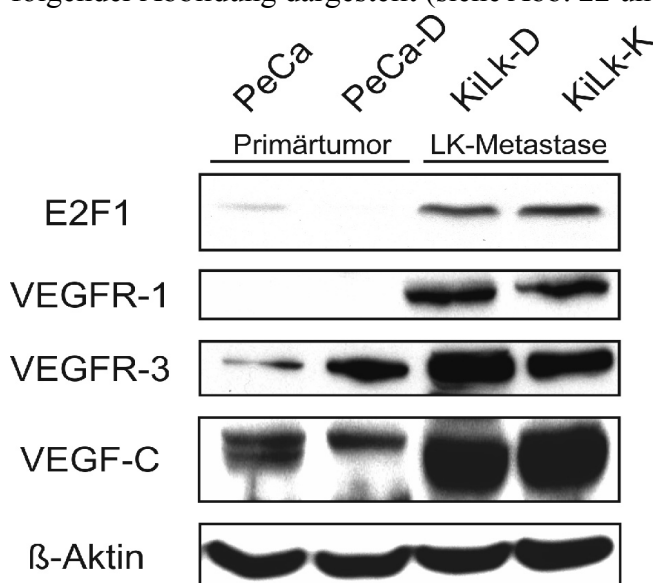


Abb. 22: Darstellung der Proteinexpression von E2F1, VEGFR-1, VEGFR-3 und VEGF-C. Die Primärtumorzellen werden mit den Lymphknotenmetastasenzellen verglichen. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

In den Lymphknotenmetastasenzellen zeigte sich eine deutlich stärkere Proteinexpression von VEGFR-1, VEGFR-3 und dessen Liganden VEGF-C korrelierend mit E2F1 im Vergleich zu den Primärtumorzellen.

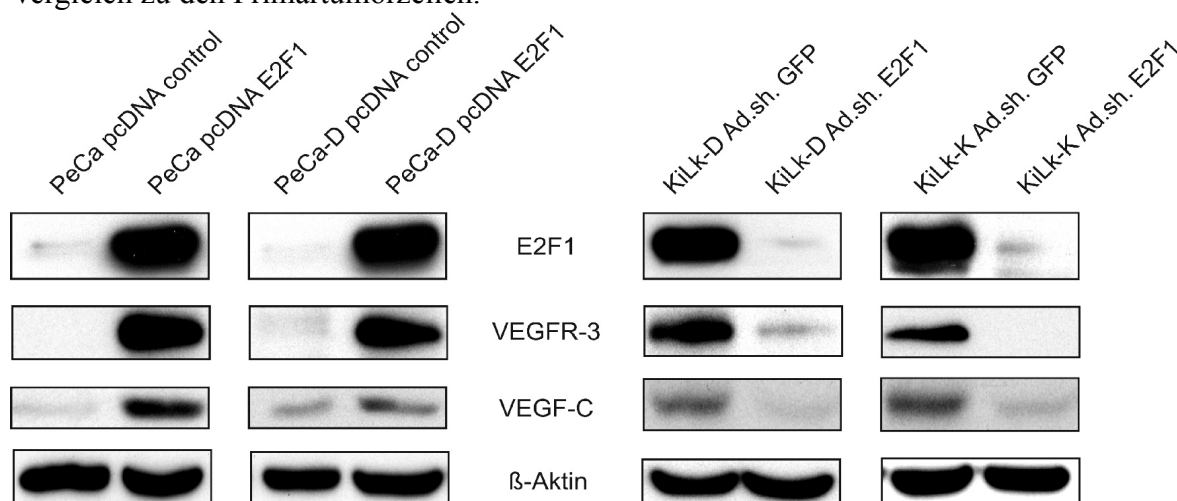


Abb. 23: Regulation von VEGFR-3 und VEGF-C durch E2F1. Links: E2F1-Überexpression in den Primärtumorzelllinien; rechts: E2F1-Knockdown in den Lymphknotenmetastasen. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Bei transienter E2F1-Depletion in den Lymphknotenmetastasenzellen zeigte sich eine deutliche Abschwächung des Expressionssignals von VEGFR-3 und VEGF-C, während Ligand und Rezeptor in Primärtumorzellen nach E2F1 Überexpression klar ansteigen. Diese Daten stützen die Annahme, dass VEGFR-3 und VEGFC im Peniskarzinomzellsystem durch E2F1 reguliert werden.

Da die Ergebnisse dieser Arbeit die zentrale Rolle von E2F1 bei der EMT *peniler* Tumorzellen offengelegt haben, wäre eine weitere Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors während der Metastasierungskaskade dieser Tumorentität denkbar. Dies ist sogar wahrscheinlich, da in aktuellen Arbeiten immer wieder die zentrale Rolle von E2F1 beim Ablauf der Metastasierung beobachtet wurde, beispielsweise bei der Extravasation im Gefäßsystem zirkulierender Tumorzellen [32]. Abgesehen davon wurde die E2F1 vermittelte Neovaskularisation durch VEGF-C und VEGFR-3 bereits bei mehreren Zelllinien beobachtet [98]. Eine Untersuchung der Neovaskularisation durch den E2F/VEGF-Signalweg in Peniskarzinomzellen wäre beispielsweise mit *in-vivo* Modellsystemen wie der transparenten-Rückenhautkammer bei Nacktmäusen möglich. Dieses Modell ermöglicht die intravitale Mikroskopie zur Bestimmung der Mikrovaskularisation nach Einbringen eines Gewebeimplantates auf den Rücken einer Nacktmaus [184]. Dadurch würde das Verständnis der molekularbiologischen Vorgänge im Peniskarzinom zunehmen wodurch auf lange Sicht neue Therapieansätze geschaffen werden könnten.

Da die Ergebnisse dieser Arbeit die generelle Wirkung von E2F1 als wichtigen Tumorprogressor während der malignen Progression bestätigt hat, sollten weitere umfangreichere Untersuchungen an histologischen Tumorproben erfolgen. Als abschließendes Ziel steht dabei die klinische Nutzung von E2F1 und seiner metastasierungsrelevanten Zielgene als diagnostischer Marker der erfolgten Lymphknotenmetastasierung und möglicherweise einer präventiven und antimetastatischen Therapie im Mittelpunkt.

6 Literaturverzeichnis

- [1] D. Hanahan und R. A. Weinberg, „Hallmarks of cancer: the next generation“, *Cell*, Bd. 144, Nr. 5, S. 646–674, März 2011.
- [2] R. Siegel, D. Naishadham, und A. Jemal, „Cancer statistics, 2013“, *CA. Cancer J. Clin.*, Bd. 63, Nr. 1, S. 11–30, Jan. 2013.
- [3] A. C. Chiang und J. Massagué, „Molecular basis of metastasis“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 359, Nr. 26, S. 2814–2823, Dez. 2008.
- [4] J. P. Thiery, „Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 2, Nr. 6, S. 442–454, Juni 2002.
- [5] P. Carmeliet und R. K. Jain, „Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases“, *Nat. Rev. Drug Discov.*, Bd. 10, Nr. 6, S. 417–427, Juni 2011.
- [6] C. Scheel und R. A. Weinberg, „Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links“, *Semin. Cancer Biol.*, Bd. 22, Nr. 5–6, S. 396–403, Okt. 2012.
- [7] E. D. Hay, „The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it“, *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, Bd. 233, Nr. 3, S. 706–720, Juli 2005.
- [8] B. S. Kowtharapu, T. Stahnke, A. Wree, R. F. Guthoff, und O. Stachs, „Corneal epithelial and neuronal interactions: Role in wound healing“, *Exp. Eye Res.*, Bd. 125, S. 53–61, Aug. 2014.
- [9] E. D. Hay, „An overview of epithelio-mesenchymal transformation“, *Acta Anat. (Basel)*, Bd. 154, Nr. 1, S. 8–20, 1995.
- [10] B. De Craene und G. Berx, „Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 13, Nr. 2, S. 97–110, Feb. 2013.
- [11] M. A. Nieto, „The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease“, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, Bd. 27, S. 347–376, 2011.
- [12] S. Ansieau, J. Bastid, A. Doreau, A.-P. Morel, B. P. Bouchet, C. Thomas, F. Fauvet, I. Puisieux, C. Doglioni, S. Piccinin, R. Maestro, T. Voeltzel, A. Selmi, S. Valsesia-Wittmann, C. Caron de Fromental, und A. Puisieux, „Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature

- senescence“, *Cancer Cell*, Bd. 14, Nr. 1, S. 79–89, Juli 2008.
- [13] M. Takeichi, „Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator“, *Science*, Bd. 251, Nr. 5000, S. 1451–1455, März 1991.
- [14] U. Cavallaro und G. Christofori, „Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 4, Nr. 2, S. 118–132, Feb. 2004.
- [15] R. S. M. Campos, A. Lopes, G. C. Guimarães, A. L. Carvalho, und F. A. Soares, „E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients“, *Urology*, Bd. 67, Nr. 4, S. 797–802, Apr. 2006.
- [16] R. B. Hazan, G. R. Phillips, R. F. Qiao, L. Norton, und S. A. Aaronson, „Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis“, *J. Cell Biol.*, Bd. 148, Nr. 4, S. 779–790, Feb. 2000.
- [17] G. Li, K. Satyamoorthy, und M. Herlyn, „N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells“, *Cancer Res.*, Bd. 61, Nr. 9, S. 3819–3825, Mai 2001.
- [18] A. Bellacosa, C. C. Kumar, A. Di Cristofano, und J. R. Testa, „Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting“, *Adv. Cancer Res.*, Bd. 94, S. 29–86, 2005.
- [19] Y. Ogawara, S. Kishishita, T. Obata, Y. Isazawa, T. Suzuki, K. Tanaka, N. Masuyama, und Y. Gotoh, „Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 277, Nr. 24, S. 21843–21850, Juni 2002.
- [20] J. A. Fresno Vara, E. Casado, J. de Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta, und M. González-Barón, „PI3K/Akt signalling pathway and cancer“, *Cancer Treat. Rev.*, Bd. 30, Nr. 2, S. 193–204, Apr. 2004.
- [21] R. Kalluri und R. A. Weinberg, „The basics of epithelial-mesenchymal transition“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 119, Nr. 6, S. 1420–1428, Juni 2009.
- [22] J. E. Eriksson, T. Dechat, B. Grin, B. Helfand, M. Mendez, H.-M. Pallari, und R. D. Goldman, „Introducing intermediate filaments: from discovery to disease“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 119, Nr. 7, S. 1763–1771, Juli 2009.
- [23] M. M. Nijkamp, P. N. Span, I. J. Hoogsteen, A. J. van der Kogel, J. H. A. M. Kaanders, und J. Bussink, „Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients“, *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, Bd. 99, Nr. 3, S. 344–348, Juni 2011.

- [24] M. Zeisberg und E. G. Neilson, „Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 119, Nr. 6, S. 1429–1437, Juni 2009.
- [25] M. A. Nieto und A. Cano, „The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity“, *Semin. Cancer Biol.*, Bd. 22, Nr. 5–6, S. 361–368, Okt. 2012.
- [26] V. Bolós, H. Peinado, M. A. Pérez-Moreno, M. F. Fraga, M. Esteller, und A. Cano, „The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors“, *J. Cell Sci.*, Bd. 116, Nr. Pt 3, S. 499–511, Feb. 2003.
- [27] M. Kajita, K. N. McClinic, und P. A. Wade, „Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 24, Nr. 17, S. 7559–7566, Sep. 2004.
- [28] T. Inukai, A. Inoue, H. Kurosawa, K. Goi, T. Shinjyo, K. Ozawa, M. Mao, T. Inaba, und A. T. Look, „SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein“, *Mol. Cell*, Bd. 4, Nr. 3, S. 343–352, Sep. 1999.
- [29] M. Shioiri, T. Shida, K. Koda, K. Oda, K. Seike, M. Nishimura, S. Takano, und M. Miyazaki, „Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients“, *Br. J. Cancer*, Bd. 94, Nr. 12, S. 1816–1822, Juni 2006.
- [30] Y. Uchikado, S. Natsugoe, H. Okumura, T. Setoyama, M. Matsumoto, S. Ishigami, und T. Aikou, „Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma“, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, Bd. 11, Nr. 3, S. 1174–1180, Feb. 2005.
- [31] C. Côme, F. Magnino, F. Bibeau, P. De Santa Barbara, K. F. Becker, C. Theillet, und P. Savagner, „Snail and slug play distinct roles during breast carcinoma progression“, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, Bd. 12, Nr. 18, S. 5395–5402, Sep. 2006.
- [32] C. Meier, A. Spitschak, K. Abshagen, S. Gupta, J. M. Mor, O. Wolkenhauer, J. Haier, B. Vollmar, V. Alla, und B. M. Pützer, „Association of RHAMM with E2F1 promotes tumor cell extravasation by transcriptional upregulation of fibronectin“, *J. Pathol.*, Juli 2014.

- [33] J. P. Thiery und J. P. Sleeman, „Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 7, Nr. 2, S. 131–142, Feb. 2006.
- [34] H.-Y. Jung, L. Fattet, und J. Yang, „Molecular Pathways: Linking Tumor Microenvironment to Epithelial-Mesenchymal Transition in Metastasis“, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, Aug. 2014.
- [35] H. M. Sowter, R. R. Raval, J. W. Moore, P. J. Ratcliffe, und A. L. Harris, „Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in regulation of the transcriptional response to hypoxia“, *Cancer Res.*, Bd. 63, Nr. 19, S. 6130–6134, Okt. 2003.
- [36] S. Sun, X. Ning, Y. Zhang, Y. Lu, Y. Nie, S. Han, L. Liu, R. Du, L. Xia, L. He, und D. Fan, „Hypoxia-inducible factor-1alpha induces Twist expression in tubular epithelial cells subjected to hypoxia, leading to epithelial-to-mesenchymal transition“, *Kidney Int.*, Bd. 75, Nr. 12, S. 1278–1287, Juni 2009.
- [37] P. A. Gregory, A. G. Bert, E. L. Paterson, S. C. Barry, A. Tsykin, G. Farshid, M. A. Vadas, Y. Khew-Goodall, und G. J. Goodall, „The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1“, *Nat. Cell Biol.*, Bd. 10, Nr. 5, S. 593–601, Mai 2008.
- [38] S. Liu, J. Cui, G. Liao, Y. Zhang, K. Ye, T. Lu, J. Qi, und G. Wan, „miR-137 regulates epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal stromal tumor“, *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*, Juni 2014.
- [39] C. F. Heyns, A. Mendoza-Valdés, und A. C. L. Pompeo, „Diagnosis and staging of penile cancer“, *Urology*, Bd. 76, Nr. 2 Suppl 1, S. S15–23, Aug. 2010.
- [40] A. A. Ornellas, E. W. Kinchin, B. L. B. Nóbrega, A. Wisnescky, N. Koifman, und R. Quirino, „Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience“, *J. Surg. Oncol.*, Bd. 97, Nr. 6, S. 487–495, Mai 2008.
- [41] „ENCR (European Network of Cancer Registries). Eurocim version 4.0. European incidence database V2.2 (1999). Lyon: ENCR; 2001.“ .
- [42] C. Ferrándiz-Pulido, I. de Torres, und V. García-Patos, „[Penile squamous cell carcinoma]“, *Actas Dermo-Sifiliográficas*, Bd. 103, Nr. 6, S. 478–487, Aug. 2012.
- [43] K. L. Brady, M. G. Mercurio, und M. D. Brown, „Malignant tumors of the penis“,

- Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. Al*, Bd. 39, Nr. 4, S. 527–547, Apr. 2013.
- [44] A. M. Mosconi, F. Roila, G. Gatta, und C. Theodore, „Cancer of the penis“, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, Bd. 53, Nr. 2, S. 165–177, Feb. 2005.
- [45] L. A. Brinton, J. Y. Li, S. D. Rong, S. Huang, B. S. Xiao, B. G. Shi, Z. J. Zhu, M. H. Schiffman, und S. Dawsey, „Risk factors for penile cancer: results from a case-control study in China“, *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, Bd. 47, Nr. 4, S. 504–509, Feb. 1991.
- [46] M. C. G. Bleeker, D. A. M. Heideman, P. J. F. Snijders, S. Horenblas, J. Dillner, und C. J. L. M. Meijer, „Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention“, *World J. Urol.*, Bd. 27, Nr. 2, S. 141–150, Apr. 2009.
- [47] M. A. Rubin, B. Kleter, M. Zhou, G. Ayala, A. L. Cubilla, W. G. Quint, und E. C. Pirog, „Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 159, Nr. 4, S. 1211–1218, Okt. 2001.
- [48] C. Maden, K. J. Sherman, A. M. Beckmann, T. G. Hislop, C. Z. Teh, R. L. Ashley, und J. R. Daling, „History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer“, *J. Natl. Cancer Inst.*, Bd. 85, Nr. 1, S. 19–24, Jan. 1993.
- [49] E. J. Schoen, M. Oehrli, C. d Colby, und G. Machin, „The highly protective effect of newborn circumcision against invasive penile cancer“, *Pediatrics*, Bd. 105, Nr. 3, S. E36, März 2000.
- [50] O. W. Hakenberg, E. Comperat, S. Minhas, A. Necchi, C. Protzel, und N. Watkin, „Guidlines on Penile Cancer, European Association of Urology“. 2014.
- [51] D. Cante, P. Franco, P. Sciacero, G. Girelli, V. Casanova Borca, P. Grosso, S. Tofani, A. Marra, M. R. La Porta, und U. Ricardi, „Penile metastasis from prostate cancer: a case report“, *Tumori*, Bd. 100, Nr. 1, S. e14–16, Feb. 2014.
- [52] A. N. van Geel, M. A. den Bakker, W. Kirkels, S. Horenblas, B. B. R. Kroon, J. H. W. de Wilt, A. M. M. Eggermont, W. J. Mooi, und M. N. A. van der Aa, „Prognosis of primary mucosal penile melanoma: a series of 19 Dutch patients and 47 patients from the literature“, *Urology*, Bd. 70, Nr. 1, S. 143–147, Juli 2007.
- [53] J. S. Barnholtz-Sloan, J. L. Maldonado, J. Pow-sang, A. R. Giuliano, und A. R. Guiliano, „Incidence trends in primary malignant penile cancer“, *Urol. Oncol.*, Bd. 25,

- Nr. 5, S. 361–367, Okt. 2007.
- [54] A. L. Cubilla, „The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis“, *World J. Urol.*, Bd. 27, Nr. 2, S. 169–177, Apr. 2009.
- [55] R. M. Cabanas, „An approach for the treatment of penile carcinoma“, *Cancer*, Bd. 39, Nr. 2, S. 456–466, Feb. 1977.
- [56] J. A. P. Leijte, B. K. Kroon, R. A. Valdés Olmos, O. E. Nieweg, und S. Horenblas, „Reliability and safety of current dynamic sentinel node biopsy for penile carcinoma“, *Eur. Urol.*, Bd. 52, Nr. 1, S. 170–177, Juli 2007.
- [57] B. K. Kroon, S. Horenblas, W. Meinhardt, H. G. van der Poel, A. Bex, H. van Tinteren, R. A. Valdés Olmos, und O. E. Nieweg, „Dynamic sentinel node biopsy in penile carcinoma: evaluation of 10 years experience“, *Eur. Urol.*, Bd. 47, Nr. 5, S. 601–606; discussion 606, Mai 2005.
- [58] A. Chaux, V. Reuter, C. Lezcano, E. Velazquez, R. Cudas, und A. L. Cubilla, „Autopsy findings in 14 patients with penile squamous cell carcinoma“, *Int. J. Surg. Pathol.*, Bd. 19, Nr. 2, S. 164–169, Apr. 2011.
- [59] A. Chaux, V. Reuter, C. Lezcano, E. F. Velazquez, J. Torres, und A. L. Cubilla, „Comparison of morphologic features and outcome of resected recurrent and nonrecurrent squamous cell carcinoma of the penis: a study of 81 cases“, *Am. J. Surg. Pathol.*, Bd. 33, Nr. 9, S. 1299–1306, Sep. 2009.
- [60] Sobin LH, Gospodariwicz M, und Wittekind C (Hrsg), „TNM Classification of Malignant Tumours.“, Bd. UICC International Union Against Cancer, Nr. 7th edn. Wiley-Blackwell, New York, 2009.
- [61] V. Ficarra, F. Zattoni, S. C. Cunico, T. P. Galetti, L. Luciani, A. Fandella, S. Guazzieri, D. Maruzzi, T. Sava, S. Siracusano, S. Pilloni, A. Tasca, G. Martignoni, M. Gardiman, R. Tardanico, T. Zambolin, A. Cisternino, W. Artibani, und Gruppo Uro-Oncologico del Nord Est (Northeast Uro-Oncological Group) Penile Cancer Project, „Lymphatic and vascular embolizations are independent predictive variables of inguinal lymph node involvement in patients with squamous cell carcinoma of the penis: Gruppo Uro-Oncologico del Nord Est (Northeast Uro-Oncological Group) Penile Cancer data base data“, *Cancer*, Bd. 103, Nr. 12, S. 2507–2516, Juni 2005.
- [62] C. Protzel, A. Alcaraz, S. Horenblas, G. Pizzocaro, A. Zlotta, und O. W. Hakenberg, „Lymphadenectomy in the surgical management of penile cancer“, *Eur.*

- Urol.*, Bd. 55, Nr. 5, S. 1075–1088, Mai 2009.
- [63] C. Protzel und O. W. Hakenberg, O.W., „Peniskarzinom, Diagnose und Therapie“, *Urologe*, Bd. 52, Nr. 1, S. 87–98, Jan. 2013.
- [64] G. Pizzocaro, F. Algaba, S. Horenblas, E. Solsona, S. Tana, H. Van Der Poel, N. A. Watkin, und European Association of Urology (EAU) Guidelines Group on Penile Cancer, „EAU penile cancer guidelines 2009“, *Eur. Urol.*, Bd. 57, Nr. 6, S. 1002–1012, Juni 2010.
- [65] S. Misra, A. Chaturvedi, und N. C. Misra, „Penile carcinoma: a challenge for the developing world“, *Lancet Oncol.*, Bd. 5, Nr. 4, S. 240–247, Apr. 2004.
- [66] Sufrin G und Huber R, *Benign and malignant lesions of the penis. In: Gillenwater JY, Howards SS, Duckett JW, editors. Adult and pediatric urology.*, 2nd ed. St. Louis: Mosby, 1991.
- [67] D. T. Maurer, C. Protzel, J. E. Gschwend, H. Rexer, und G. der Auo, „Inguinale Lymphadenektomie beim Peniskarzinom“, *Urol.*, Bd. 53, Nr. 4, S. 561–562, Apr. 2014.
- [68] C. Protzel, A. K. Seitz, O. W. Hakenberg, und M. Retz, „[Neoadjuvant, adjuvant and palliative chemotherapy of penile cancer]“, *Urol. Ausg A*, Bd. 52, Nr. 11, S. 1556–1560, 1562–1563, Nov. 2013.
- [69] B. K. Kroon, S. Horenblas, A. P. Lont, P. J. Tanis, M. P. W. Gallee, und O. E. Nieweg, „Patients with penile carcinoma benefit from immediate resection of clinically occult lymph node metastases“, *J. Urol.*, Bd. 173, Nr. 3, S. 816–819, März 2005.
- [70] C. Protzel und O. W. Hakenberg, „Chemotherapy in patients with penile carcinoma“, *Urol. Int.*, Bd. 82, Nr. 1, S. 1–7, 2009.
- [71] C. Protzel, S. Ruppin, S. Milerski, K.-J. Klebingat, und O. W. Hakenberg, „[The current state of the art of chemotherapy of penile cancer: results of a nationwide survey of German clinics]“, *Urol. Ausg A*, Bd. 48, Nr. 12, S. 1495–1498, Dez. 2009.
- [72] C. Bermejo, J. E. Busby, P. E. Spiess, L. Heller, L. C. Pagliaro, und C. A. Pettaway, „Neoadjuvant chemotherapy followed by aggressive surgical consolidation for metastatic penile squamous cell carcinoma“, *J. Urol.*, Bd. 177, Nr. 4, S. 1335–1338, Apr. 2007.
- [73] G. Pizzocaro, N. Nicolai, und A. Milani, „Taxanes in combination with cisplatin and fluorouracil for advanced penile cancer: preliminary results“, *Eur. Urol.*, Bd. 55, Nr. 3, S. 546–551, März 2009.

- [74] A. K. Seitz, C. Protzel, M. Retz, und Arbeitsgemeinschaft Urologische Onkologie (AUO) der Deutschen Krebsgesellschaft e. V., „[Current state of chemotherapy in treatment of advanced penile cancer]“, *Aktuelle Urol.*, Bd. 45, Nr. 4, S. 286–292, Juli 2014.
- [75] B. K. Kroon, S. Horenblas, A. P. Lont, P. J. Tanis, M. P. W. Gallee, und O. E. Nieweg, „Patients with penile carcinoma benefit from immediate resection of clinically occult lymph node metastases“, *J. Urol.*, Bd. 173, Nr. 3, S. 816–819, März 2005.
- [76] E. F. Velazquez, G. Ayala, H. Liu, A. Chaux, M. Zanotti, J. Torres, S. I. Cho, J. E. Barreto, F. Soares, und A. L. Cubilla, „Histologic grade and perineural invasion are more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10 mm“, *Am. J. Surg. Pathol.*, Bd. 32, Nr. 7, S. 974–979, Juli 2008.
- [77] E. F. Velazquez, A. Soskin, A. Bock, R. Cudas, J. E. Barreto, und A. L. Cubilla, „Positive resection margins in partial penectomies: sites of involvement and proposal of local routes of spread of penile squamous cell carcinoma“, *Am. J. Surg. Pathol.*, Bd. 28, Nr. 3, S. 384–389, März 2004.
- [78] J. Dillner, G. von Krogh, S. Horenblas, und C. J. Meijer, „Etiology of squamous cell carcinoma of the penis“, *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.*, Nr. 205, S. 189–193, 2000.
- [79] L. M. Coussens und Z. Werb, „Inflammation and cancer“, *Nature*, Bd. 420, Nr. 6917, S. 860–867, Dez. 2002.
- [80] M. Poetsch, M. Hemmerich, C. Kakies, B. Kleist, E. Wolf, F. vom Dorp, O. W. Hakenberg, und C. Protzel, „Alterations in the tumor suppressor gene p16(INK4A) are associated with aggressive behavior of penile carcinomas“, *Virchows Arch. Int. J. Pathol.*, Bd. 458, Nr. 2, S. 221–229, Feb. 2011.
- [81] P. Schulz, A. Scholz, A. Rexin, P. Hauff, M. Schirner, B. Wiedenmann, und K. Detjen, „Inducible re-expression of p16 in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis“, *Br. J. Cancer*, Bd. 99, Nr. 1, S. 110–117, Juli 2008.
- [82] M. Poetsch, B.-J. Schuart, G. Schwesinger, B. Kleist, und C. Protzel, „Screening of microsatellite markers in penile cancer reveals differences between metastatic and nonmetastatic carcinomas“, *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.*, Bd. 20,

- Nr. 10, S. 1069–1077, Okt. 2007.
- [83] H. zur Hausen, „Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account“, *Virology*, Bd. 384, Nr. 2, S. 260–265, Feb. 2009.
- [84] D. M. Prowse, E. N. Ktori, D. Chandrasekaran, A. Prapa, und S. Baithun, „Human papillomavirus-associated increase in p16INK4A expression in penile lichen sclerosus and squamous cell carcinoma“, *Br. J. Dermatol.*, Bd. 158, Nr. 2, S. 261–265, Feb. 2008.
- [85] D. Engelmann und B. M. Pützer, „The dark side of E2F1: in transit beyond apoptosis“, *Cancer Res.*, Bd. 72, Nr. 3, S. 571–575, Feb. 2012.
- [86] D. L. Burkhardt und J. Sage, „Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 8, Nr. 9, S. 671–682, Sep. 2008.
- [87] D. J. Riley, E. Y. Lee, und W. H. Lee, „The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor“, *Annu. Rev. Cell Biol.*, Bd. 10, S. 1–29, 1994.
- [88] T. Udayakumar, M. M. Shareef, D. A. Diaz, M. M. Ahmed, und A. Pollack, „The E2F1/Rb and p53/MDM2 pathways in DNA repair and apoptosis: understanding the crosstalk to develop novel strategies for prostate cancer radiotherapy“, *Semin. Radiat. Oncol.*, Bd. 20, Nr. 4, S. 258–266, Okt. 2010.
- [89] H.-Z. Chen, S.-Y. Tsai, und G. Leone, „Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 9, Nr. 11, S. 785–797, Nov. 2009.
- [90] B. Perez-Ordóñez, M. Beauchemin, und R. C. K. Jordan, „Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck“, *J. Clin. Pathol.*, Bd. 59, Nr. 5, S. 445–453, Mai 2006.
- [91] J. Doorbar, „Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer“, *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, Bd. 110, Nr. 5, S. 525–541, Mai 2006.
- [92] S.-H. Sang-Hyuk Lee, N.-H. Lee, S.-M. Jin, Y.-S. Rho, und S.-J. Jo, „Loss of heterozygosity of tumor suppressor genes (p16, Rb, E-cadherin, p53) in hypopharynx squamous cell carcinoma“, *Otolaryngol.--Head Neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol.-Head Neck Surg.*, Bd. 145, Nr. 1, S. 64–70, Juli 2011.
- [93] F. A. Dick und S. M. Rubin, „Molecular mechanisms underlying RB protein function“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 14, Nr. 5, S. 297–306, Mai 2013.
- [94] D. Trouche und T. Kouzarides, „E2F1 and E1A(12S) have a homologous activation domain regulated by RB and CBP“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 93, Nr. 4, S.

- 1439–1442, Feb. 1996.
- [95] D. Ginsberg, „E2F1 pathways to apoptosis“, *FEBS Lett.*, Bd. 529, Nr. 1, S. 122–125, Okt. 2002.
- [96] B. M. Pützer und D. Engelmann, „E2F1 apoptosis counterattacked: evil strikes back“, *Trends Mol. Med.*, Bd. 19, Nr. 2, S. 89–98, Feb. 2013.
- [97] V. Alla, D. Engelmann, A. Niemetz, J. Pahnke, A. Schmidt, M. Kunz, S. Emmrich, M. Steder, D. Koczan, und B. M. Pützer, „E2F1 in melanoma progression and metastasis“, *J. Natl. Cancer Inst.*, Bd. 102, Nr. 2, S. 127–133, Jan. 2010.
- [98] D. Engelmann, D. Mayoli-Nüssle, C. Mayrhofer, K. Fürst, V. Alla, A. Stoll, A. Spitschak, K. Abshagen, B. Vollmar, S. Ran, und B. M. Pützer, „E2F1 promotes angiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 axis in a feedback loop for cooperative induction of PDGF-B“, *J. Mol. Cell Biol.*, Bd. 5, Nr. 6, S. 391–403, Dez. 2013.
- [99] A. Xanthoulis und D. G. Tiniakos, „E2F transcription factors and digestive system malignancies: how much do we know?“, *World J. Gastroenterol. WJG*, Bd. 19, Nr. 21, S. 3189–3198, Juni 2013.
- [100] J. DeGregori, T. Kowalik, und J. R. Nevins, „Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 15, Nr. 8, S. 4215–4224, Aug. 1995.
- [101] D. Chen, M. Pacal, P. Wenzel, P. S. Knoepfler, G. Leone, und R. Bremner, „Division and apoptosis of E2f-deficient retinal progenitors“, *Nature*, Bd. 462, Nr. 7275, S. 925–929, Dez. 2009.
- [102] J.-L. Chong, P. L. Wenzel, M. T. Sáenz-Robles, V. Nair, A. Ferrey, J. P. Hagan, Y. M. Gomez, N. Sharma, H.-Z. Chen, M. Ouseph, S.-H. Wang, P. Trikha, B. Culp, L. Mezache, D. J. Winton, O. J. Sansom, D. Chen, R. Bremner, P. G. Cantalupo, M. L. Robinson, J. M. Pipas, und G. Leone, „E2f1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells“, *Nature*, Bd. 462, Nr. 7275, S. 930–934, Dez. 2009.
- [103] J.-S. Lee, S.-H. Leem, S.-Y. Lee, S.-C. Kim, E.-S. Park, S.-B. Kim, S.-K. Kim, Y.-J. Kim, W.-J. Kim, und I.-S. Chu, „Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors“, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, Bd. 28, Nr. 16, S. 2660–2667, Juni 2010.
- [104] M. G. Andrusiak, K. A. McClellan, D. Dugal-Tessier, L. M. Julian, S. P. Rodrigues,

- D. S. Park, T. E. Kennedy, und R. S. Slack, „Rb/E2F regulates expression of neogenin during neuronal migration“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 31, Nr. 2, S. 238–247, Jan. 2011.
- [105] K. A. McClellan, V. A. Ruzhynsky, D. N. Douda, J. L. Vanderluit, K. L. Ferguson, D. Chen, R. Bremner, D. S. Park, G. Leone, und R. S. Slack, „Unique requirement for Rb/E2F3 in neuronal migration: evidence for cell cycle-independent functions“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 27, Nr. 13, S. 4825–4843, Juli 2007.
- [106] S. Boo und L. Dagnino, „Integrins as Modulators of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dermal Fibroblasts During Skin Regeneration After Injury“, *Adv. Wound Care*, Bd. 2, Nr. 5, S. 238–246, Juni 2013.
- [107] M. Skobe, T. Hawighorst, D. G. Jackson, R. Prevo, L. Janes, P. Velasco, L. Riccardi, K. Alitalo, K. Claffey, und M. Detmar, „Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis“, *Nat. Med.*, Bd. 7, Nr. 2, S. 192–198, Feb. 2001.
- [108] J.-L. Su, P.-C. Yang, J.-Y. Shih, C.-Y. Yang, L.-H. Wei, C.-Y. Hsieh, C.-H. Chou, Y.-M. Jeng, M.-Y. Wang, K.-J. Chang, M.-C. Hung, und M.-L. Kuo, „The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells“, *Cancer Cell*, Bd. 9, Nr. 3, S. 209–223, März 2006.
- [109] J.-L. Su, C.-J. Yen, P.-S. Chen, S.-E. Chuang, C.-C. Hong, I.-H. Kuo, H.-Y. Chen, M.-C. Hung, und M.-L. Kuo, „The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression“, *Br. J. Cancer*, Bd. 96, Nr. 4, S. 541–545, Feb. 2007.
- [110] J. Wang, A. Taylor, R. Showeil, P. Trivedi, Y. Horimoto, I. Bagwan, L. Ewington, E. W.-F. Lam, und M. A. El-Bahrawy, „Expression profiling and significance of VEGF-A, VEGFR2, VEGFR3 and related proteins in endometrial carcinoma“, *Cytokine*, Bd. 68, Nr. 2, S. 94–100, Aug. 2014.
- [111] D. Witte, A. Thomas, N. Ali, N. Carlson, und M. Younes, „Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma“, *Anticancer Res.*, Bd. 22, Nr. 3, S. 1463–1466, Juni 2002.
- [112] J. Stanelle und B. M. Pützer, „E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics“, *Trends Mol. Med.*, Bd. 12, Nr. 4, S. 177–185, Apr. 2006.
- [113] S. Han, K. Park, B.-N. Bae, K. H. Kim, H.-J. Kim, Y.-D. Kim, und H.-Y. Kim, „E2F1 expression is related with the poor survival of lymph node-positive breast

- cancer patients treated with fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide“, *Breast Cancer Res. Treat.*, Bd. 82, Nr. 1, S. 11–16, Nov. 2003.
- [114] S. Buhlmann und B. M. Pützer, „DNp73 a matter of cancer: mechanisms and clinical implications“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1785, Nr. 2, S. 207–216, Apr. 2008.
- [115] T. Stiewe, C. C. Theseling, und B. M. Pützer, „Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 277, Nr. 16, S. 14177–14185, Apr. 2002.
- [116] V. Alla, B. S. Kowtharapu, D. Engelmann, S. Emmrich, U. Schmitz, M. Steder, und B. M. Pützer, „E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR-205 circuitry“, *Cell Cycle Georget. Tex.*, Bd. 11, Nr. 16, S. 3067–3078, Aug. 2012.
- [117] C. M. Naumann, J. Sperveslage, M. F. Hamann, I. Leuschner, L. Weder, A. A. Al-Najar, J. Lemke, B. Sipos, K.-P. Jünemann, und H. Kalthoff, „Establishment and characterization of primary cell lines of squamous cell carcinoma of the penis and its metastasis“, *J. Urol.*, Bd. 187, Nr. 6, S. 2236–2242, Juni 2012.
- [118] S. Gunia, C. Kakies, A. Erbersdobler, O. W. Hakenberg, S. Koch, und M. May, „Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: p53 predicts poor prognosis“, *J. Clin. Pathol.*, Bd. 65, Nr. 3, S. 232–236, März 2012.
- [119] M. Ofir, D. Hacohen, und D. Ginsberg, „MiR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting cyclin E“, *Mol. Cancer Res. MCR*, Bd. 9, Nr. 4, S. 440–447, Apr. 2011.
- [120] G. Pizzocaro, N. Nicolai, und A. Milani, „Taxanes in combination with cisplatin and fluorouracil for advanced penile cancer: preliminary results“, *Eur. Urol.*, Bd. 55, Nr. 3, S. 546–551, März 2009.
- [121] G.-C. Huang, S.-Y. Liu, M.-H. Lin, Y.-Y. Kuo, und Y.-C. Liu, „The synergistic cytotoxicity of cisplatin and taxol in killing oral squamous cell carcinoma“, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, Bd. 34, Nr. 9, S. 499–504, Sep. 2004.
- [122] C. Protzel und O. W. Hakenberg, „New Horizons in the Diagnosis, Treatment, and Prevention of Penile Cancer“, in *Penile Cancer*, P. E. Spiess, Hrsg. Humana Press, 2013, S. 143–155.
- [123] C. Attwooll, E. Lazzerini Denchi, und K. Helin, „The E2F family: specific functions and overlapping interests“, *EMBO J.*, Bd. 23, Nr. 24, S. 4709–4716, Dez.

2004.

- [124] D. Engelmann, S. Knoll, D. Ewerth, M. Steder, A. Stoll, und B. M. Pützer, „Functional interplay between E2F1 and chemotherapeutic drugs defines immediate E2F1 target genes crucial for cancer cell death“, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, Bd. 67, Nr. 6, S. 931–948, März 2010.
- [125] S. Knoll, K. Fürst, B. Kowtharapu, U. Schmitz, S. Marquardt, O. Wolkenhauer, H. Martin, und B. M. Pützer, „E2F1 induces miR-224/452 expression to drive EMT through TXNIP downregulation“, *EMBO Rep.*, Bd. 15, Nr. 12, S. 1315–1329, Dez. 2014.
- [126] A. L. Cubilla, B. Lloveras, M. Alejo, O. Clavero, A. Chaux, E. Kasamatsu, N. Monfuleda, S. Tous, L. Alemany, J. Klaustermeier, N. Muñoz, W. Quint, S. de Sanjose, und F. X. Bosch, „Value of p16(INK)⁴(a) in the pathology of invasive penile squamous cell carcinomas: A report of 202 cases“, *Am. J. Surg. Pathol.*, Bd. 35, Nr. 2, S. 253–261, Feb. 2011.
- [127] E. Stankiewicz, D. M. Prowse, E. Ktori, J. Cuzick, L. Ambroisine, X. Zhang, S. Kudahetti, N. Watkin, C. Corbishley, und D. M. Berney, „The retinoblastoma protein/p16 INK4A pathway but not p53 is disrupted by human papillomavirus in penile squamous cell carcinoma“, *Histopathology*, Bd. 58, Nr. 3, S. 433–439, Feb. 2011.
- [128] C. Protzel und P. E. Spiess, „Molecular research in penile cancer-lessons learned from the past and bright horizons of the future?“, *Int. J. Mol. Sci.*, Bd. 14, Nr. 10, S. 19494–19505, 2013.
- [129] Y. Yarden und M. X. Sliwkowski, „Untangling the ErbB signalling network“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 2, Nr. 2, S. 127–137, Feb. 2001.
- [130] N. E. Hynes und H. A. Lane, „ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 5, Nr. 5, S. 341–354, Mai 2005.
- [131] C. Börgermann, K. J. Schmitz, S. Sommer, H. Rübber, und S. Krege, „[Characterization of the EGF receptor status in penile cancer : retrospective analysis of the course of the disease in 45 patients]“, *Urol. Ausg A*, Bd. 48, Nr. 12, S. 1483–1489, Dez. 2009.
- [132] D. Tao, Y. Pan, G. Jiang, H. Lu, S. Zheng, H. Lin, und F. Cao, „B-Myb regulates snail expression to promote epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of

- breast cancer cell“, *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.*, Bd. 32, Nr. 1, S. 412, Jan. 2015.
- [133] S. Knoll, S. Emmrich, und B. M. Pützer, „The E2F1-miRNA cancer progression network“, *Adv. Exp. Med. Biol.*, Bd. 774, S. 135–147, 2013.
- [134] Y. Gu, Y. Cheng, Y. Song, Z. Zhang, M. Deng, C. Wang, G. Zheng, und Z. He, „MicroRNA-493 Suppresses Tumor Growth, Invasion and Metastasis of Lung Cancer by Regulating E2F1“, *PLoS ONE*, Bd. 9, Nr. 8, S. e102602, Aug. 2014.
- [135] A. A. Dar, S. Majid, D. de Semir, M. Nosrati, V. Bezrookove, und M. Kashani-Sabet, „miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 286, Nr. 19, S. 16606–16614, Mai 2011.
- [136] B. Eymin, S. Gazzeri, C. Brambilla, und E. Brambilla, „Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma“, *Oncogene*, Bd. 20, Nr. 14, S. 1678–1687, März 2001.
- [137] J.-S. Lee, S.-H. Leem, S.-Y. Lee, S.-C. Kim, E.-S. Park, S.-B. Kim, S.-K. Kim, Y.-J. Kim, W.-J. Kim, und I.-S. Chu, „Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors“, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, Bd. 28, Nr. 16, S. 2660–2667, Juni 2010.
- [138] Y. Li, L. Jia, D. Ren, C. Liu, Y. Gong, N. Wang, X. Zhang, und Y. Zhao, „Axl mediates tumor invasion and chemosensitivity through PI3K/Akt signaling pathway and is transcriptionally regulated by slug in breast carcinoma“, *IUBMB Life*, Bd. 66, Nr. 7, S. 507–518, Juli 2014.
- [139] E. Sánchez-Tilló, Y. Liu, O. de Barrios, L. Siles, L. Fanlo, M. Cuatrecasas, D. S. Darling, D. C. Dean, A. Castells, und A. Postigo, „EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness“, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, Bd. 69, Nr. 20, S. 3429–3456, Okt. 2012.
- [140] P. Lu, V. M. Weaver, und Z. Werb, „The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression“, *J. Cell Biol.*, Bd. 196, Nr. 4, S. 395–406, Feb. 2012.
- [141] S. Kaufhold und B. Bonavida, „Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention“, *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, Bd. 33, Nr. 1, S. 62, Aug. 2014.
- [142] X. Zhao und J.-L. Guan, „Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell

- migration and angiogenesis“, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Bd. 63, Nr. 8, S. 610–615, Juli 2011.
- [143] J. V. Joseph, S. Conroy, K. Pavlov, P. Sontakke, T. Tomar, E. Eggens-Meijer, V. Balasubramaniyan, M. Wagemakers, W. F. A. den Dunnen, und F. A. E. Kruyt, „Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 α -ZEB1 axis“, *Cancer Lett.*, Bd. 359, Nr. 1, S. 107–116, Apr. 2015.
- [144] J. Pouyssegur, F. Dayan, und N. M. Mazure, „Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression“, *Nature*, Bd. 441, Nr. 7092, S. 437–443, Mai 2006.
- [145] A. L. Harris, „Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth“, *Nat. Rev. Cancer*, Bd. 2, Nr. 1, S. 38–47, Jan. 2002.
- [146] D. Chen, M. Pacal, P. Wenzel, P. S. Knoepfler, G. Leone, und R. Bremner, „Division and apoptosis of E2f-deficient retinal progenitors“, *Nature*, Bd. 462, Nr. 7275, S. 925–929, Dez. 2009.
- [147] S.-Y. Tsai, R. Opavsky, N. Sharma, L. Wu, S. Naidu, E. Nolan, E. Feria-Arias, C. Timmers, J. Opavska, A. de Bruin, J.-L. Chong, P. Trikha, S. A. Fernandez, P. Stromberg, T. J. Rosol, und G. Leone, „Mouse development with a single E2F activator“, *Nature*, Bd. 454, Nr. 7208, S. 1137–1141, Aug. 2008.
- [148] J. Li, C. Ran, E. Li, F. Gordon, G. Comstock, H. Siddiqui, W. Cleghorn, H.-Z. Chen, K. Kornacker, C.-G. Liu, S. K. Pandit, M. Khanizadeh, M. Weinstein, G. Leone, und A. de Bruin, „Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development“, *Dev. Cell*, Bd. 14, Nr. 1, S. 62–75, Jan. 2008.
- [149] P. O. Humbert, R. Verona, J. M. Trimarchi, C. Rogers, S. Dandapani, und J. A. Lees, „E2f3 is critical for normal cellular proliferation“, *Genes Dev.*, Bd. 14, Nr. 6, S. 690–703, März 2000.
- [150] S. Pillai, J. Trevino, B. Rawal, S. Singh, M. Kovacs, X. Li, M. Schell, E. Haura, G. Bepler, und S. Chellappan, „ β -arrestin-1 mediates nicotine-induced metastasis through E2F1 target genes that modulate epithelial-mesenchymal transition“, *Cancer Res.*, Bd. 75, Nr. 6, S. 1009–1020, März 2015.
- [151] C. Schaal, S. Pillai, und S. P. Chellappan, „The Rb-E2F transcriptional regulatory pathway in tumor angiogenesis and metastasis“, *Adv. Cancer Res.*, Bd. 121, S. 147–

- 182, 2014.
- [152] Y. Arima, Y. Inoue, T. Shibata, H. Hayashi, O. Nagano, H. Saya, und Y. Taya, „Rb depletion results in deregulation of E-cadherin and induction of cellular phenotypic changes that are characteristic of the epithelial-to-mesenchymal transition“, *Cancer Res.*, Bd. 68, Nr. 13, S. 5104–5112, Juli 2008.
- [153] J. L. Johnson, S. Pillai, D. Pernazza, S. M. Sebt, N. J. Lawrence, und S. P. Chellappan, „Regulation of matrix metalloproteinase genes by E2F transcription factors: Rb-Raf-1 interaction as a novel target for metastatic disease“, *Cancer Res.*, Bd. 72, Nr. 2, S. 516–526, Jan. 2012.
- [154] Z. Li, Y. Guo, H. Jiang, T. Zhang, C. Jin, C. Y. F. Young, und H. Yuan, „Differential regulation of MMPs by E2F1, Sp1 and NF-kappa B controls the small cell lung cancer invasive phenotype“, *BMC Cancer*, Bd. 14, S. 276, 2014.
- [155] K. J. Davies, „The Complex Interaction of Matrix Metalloproteinases in the Migration of Cancer Cells through Breast Tissue Stroma“, *Int. J. Breast Cancer*, Bd. 2014, S. 839094, 2014.
- [156] C. Börgermann, K. J. Schmitz, S. Sommer, H. Rübber, und S. Kregge, „[Characterization of the EGF receptor status in penile cancer : retrospective analysis of the course of the disease in 45 patients]“, *Urol. Ausg A*, Bd. 48, Nr. 12, S. 1483–1489, Dez. 2009.
- [157] M. L. Ackland, D. F. Newgreen, M. Fridman, M. C. Waltham, A. Arvanitis, J. Minichiello, J. T. Price, und E. W. Thompson, „Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells“, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, Bd. 83, Nr. 3, S. 435–448, März 2003.
- [158] Y. Wang, Z. Lin, L. Sun, S. Fan, Z. Huang, D. Zhang, Z. Yang, J. Li, und W. Chen, „Akt/Ezrin Tyr353/NF-κB pathway regulates EGF-induced EMT and metastasis in tongue squamous cell carcinoma“, *Br. J. Cancer*, Bd. 110, Nr. 3, S. 695–705, Feb. 2014.
- [159] G.-H. Ha, J.-L. Kim, und E.-K. Y. Breuer, „TACC3 is essential for EGF-mediated EMT in cervical cancer“, *PloS One*, Bd. 8, Nr. 8, S. e70353, 2013.
- [160] C. Protzel, M. Richter, M. Poetsch, C. Kakies, U. Zimmermann, C. Woenckhaus, K. J. Klebingat, O. W. Hakenberg, und J. Giebel, „The role of annexins I, II and IV in tumor development, progression and metastasis of human penile squamous cell

- carcinomas“, *World J. Urol.*, Bd. 29, Nr. 3, S. 393–398, Juni 2011.
- [161] B. A. Babbin, W. Y. Lee, C. A. Parkos, L. M. Winfree, A. Akyildiz, M. Perretti, und A. Nusrat, „Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 281, Nr. 28, S. 19588–19599, Juli 2006.
- [162] „Fachinformation Cisplatin Medac 0,5 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung; Zulassungsnummer 3381.00.00 (Deutschland)“. medac Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Feb-2011.
- [163] „Fachinformation Paclitaxel Hospira 6 mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung; Zulassungsnummer 61314.00.00 (Deutschland)“. Hospira Deutschland GmbH, Pharmazeutischer Unternehmer, Jan-2011.
- [164] S. Kim, J. Yao, K. Suyama, X. Qian, B.-Z. Qian, S. Bandyopadhyay, O. Loudig, C. De Leon-Rodriguez, Z. N. Zhou, J. Segall, F. Macian, L. Norton, und R. B. Hazan, „Slug Promotes Survival during Metastasis through Suppression of Puma-Mediated Apoptosis“, *Cancer Res.*, Bd. 74, Nr. 14, S. 3695–3706, Juli 2014.
- [165] Y. Yoshihara, D. Wu, N. Kubo, M. Sang, A. Nakagawara, und T. Ozaki, „Inhibitory role of E2F-1 in the regulation of tumor suppressor p53 during DNA damage response“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 421, Nr. 1, S. 57–63, Apr. 2012.
- [166] M. Bug und M. Dobbelstein, „Anthracyclines induce the accumulation of mutant p53 through E2F1-dependent and -independent mechanisms“, *Oncogene*, Bd. 30, Nr. 33, S. 3612–3624, Aug. 2011.
- [167] Y. Wang, Y. X. Zhang, C. Z. Kong, Z. Zhang, und Y. Y. Zhu, „Loss of P53 facilitates invasion and metastasis of prostate cancer cells“, *Mol. Cell. Biochem.*, Bd. 384, Nr. 1–2, S. 121–127, Dez. 2013.
- [168] N. S. Chari, N. L. Pinaire, L. Thorpe, L. J. Medeiros, M. J. Routbort, und T. J. McDonnell, „The p53 tumor suppressor network in cancer and the therapeutic modulation of cell death“, *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*, Bd. 14, Nr. 4, S. 336–347, Apr. 2009.
- [169] A. Lopes, A. L. R. Bezerra, C. A. L. Pinto, S. V. Serrano, C. A. de Mello, und L. L. Villa, „p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy“, *J. Urol.*, Bd. 168, Nr. 1, S. 81–86, Juli 2002.
- [170] A. C. P. Martins, S. M. Faria, A. J. Cologna, H. J. Suaid, und S. Tucci,

- „Immunoexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma“, *J. Urol.*, Bd. 167, Nr. 1, S. 89–92; discussion 92–93, Jan. 2002.
- [171] V. Noronha, V. Patil, V. Ostwal, H. Tongaonkar, G. Bakshi, und K. Prabhash, „Role of paclitaxel and platinum-based adjuvant chemotherapy in high-risk penile cancer“, *Urol. Ann.*, Bd. 4, Nr. 3, S. 150–153, Sep. 2012.
- [172] F. H. Dexeus, C. J. Logothetis, A. Sella, R. Amato, R. Kilbourn, K. Fitz, und A. Striegel, „Combination chemotherapy with methotrexate, bleomycin and cisplatin for advanced squamous cell carcinoma of the male genital tract“, *J. Urol.*, Bd. 146, Nr. 5, S. 1284–1287, Nov. 1991.
- [173] C. Protzel, A. K. Seitz, O. W. Hakenberg, und M. Retz, „[Neoadjuvant, adjuvant and palliative chemotherapy of penile cancer]“, *Urol. Ausg A*, Bd. 52, Nr. 11, S. 1556–1560, 1562–1563, Nov. 2013.
- [174] D. A. Corral, A. Sella, C. A. Pettaway, R. J. Amato, D. M. Jones, und J. Ellerhorst, „Combination chemotherapy for metastatic or locally advanced genitourinary squamous cell carcinoma: a phase II study of methotrexate, cisplatin and bleomycin“, *J. Urol.*, Bd. 160, Nr. 5, S. 1770–1774, Nov. 1998.
- [175] S. Valastyan und R. A. Weinberg, „Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms“, *Cell*, Bd. 147, Nr. 2, S. 275–292, Okt. 2011.
- [176] S. Giampieri, C. Manning, S. Hooper, L. Jones, C. S. Hill, und E. Sahai, „Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility“, *Nat. Cell Biol.*, Bd. 11, Nr. 11, S. 1287–1296, Nov. 2009.
- [177] M. Sonoshita, M. Aoki, H. Fuwa, K. Aoki, H. Hosogi, Y. Sakai, H. Hashida, A. Takabayashi, M. Sasaki, S. Robine, K. Itoh, K. Yoshioka, F. Kakizaki, T. Kitamura, M. Oshima, und M. M. Taketo, „Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling“, *Cancer Cell*, Bd. 19, Nr. 1, S. 125–137, Jan. 2011.
- [178] P. Carmeliet und R. K. Jain, „Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases“, *Nat. Rev. Drug Discov.*, Bd. 10, Nr. 6, S. 417–427, Juni 2011.
- [179] K. Mittal, J. Ebos, und B. Rini, „Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond“, *Semin. Oncol.*, Bd. 41, Nr. 2, S. 235–251, Apr. 2014.

- [180] N. Ferrara und T. Davis-Smyth, „The biology of vascular endothelial growth factor“, *Endocr. Rev.*, Bd. 18, Nr. 1, S. 4–25, Feb. 1997.
- [181] L. Strizzi, A. Catalano, G. Vianale, S. Orecchia, A. Casalini, G. Tassi, R. Puntoni, L. Mutti, und A. Procopio, „Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma“, *J. Pathol.*, Bd. 193, Nr. 4, S. 468–475, Apr. 2001.
- [182] S. Dias, M. Choy, K. Alitalo, und S. Rafii, „Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy“, *Blood*, Bd. 99, Nr. 6, S. 2179–2184, März 2002.
- [183] T. V. Byzova, C. K. Goldman, N. Pampori, K. A. Thomas, A. Bett, S. J. Shattil, und E. F. Plow, „A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins“, *Mol. Cell*, Bd. 6, Nr. 4, S. 851–860, Okt. 2000.
- [184] H. A. Lehr, M. Leunig, M. D. Menger, D. Nolte, und K. Messmer, „Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 143, Nr. 4, S. 1055–1062, Okt. 1993.

7 Anhang

7.1 Thesen für die Disputation

1. Die vier untersuchten Peniskarzinomzelllinien lassen sich bezüglich ihrer malignen Eigenschaften als auch ihrer Proteinexpression in zwei Primärtumorzelllinien und zwei erheblich aggressivere Metastasenzelllinien unterteilen.
2. Der RB-E2F1 Signalweg, der in gesunden Zellen mit der Regulation des Zellzyklus assoziiert wird, ist in den Metastasenzellen dereguliert.
3. Die als Marker der Epithelial-Mesenchymalen Transition bekannten Proteine N-Catherin, Vimentin und Slug werden durch E2F1 hochreguliert und könnten somit zu einem aggressiverem Verhalten der Metastasenzellen beitragen.
4. Der zytostatische Wirkstoff Paclitaxel ist den Wirkstoffen Cisplatin und 5-Fluoruracil bei den *in-vitro* Versuchen deutlich überlegen und ist somit relevant für die klinische Therapie.
5. Die Metastasenzellen des Untersuchungsgutes sind erheblich resistenter gegenüber zytostatischer Behandlung als die Primärtumorzellen.
6. Die Metastasenzelllinien des Untersuchungsgutes zeigten ein erheblich invasiveres Wachstum als die Primärtumorzellen.
7. Nach E2F1-Knockdown durch virale Transduktion wurden die untersuchten Metastasenzellen signifikant sensitiver gegenüber einer zytostatischen Behandlung. E2F1 scheint somit eine Rolle bei der Zytostatikaresistenz der Metastasenzellen zu spielen.
8. Bei E2F1 Knockdown durch virale Transduktion verringerte sich das invasive Wachstum der Metastasenzellen deutlich, ohne die Proliferation zu beeinflussen. E2F1 scheint somit einen Einfluss auf die Invasivität auszuüben, der im Zusammenhang mit der EMT stehen könnte.

9. Bei E2F1- Überexpression in den Primärtumorzellen durch Transfektion erhöht sich deren invasives Wachstum, ohne die Proliferation zu beeinflussen. E2F1 könnte somit als Prädiktor oder Ziel einer Targettherapie klinisch geeignet sein.
10. Die angiogeneseregulierenden Faktoren VEGF-C und VEGFR-3 werden in diesem Zellsystem durch E2F1 reguliert. E2F1 könnte also auch in dem Bereich der Intravasation und im weiteren Verlauf der Metastasierungskaskade eine Rolle spielen.

7.2 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Ferdinand Fenner